

渔业科学进展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES



第40卷 VOL.40 第3期 NO.3



中国水产科学研究院黄海水产研究所 主办
中国水产学会



科学出版社 出版
Science Press

渔业科学进展

YUYE KEXUE JINZHAN

第 40 卷 第 3 期

2019 年 6 月

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

目 次

研究论文

- 基于渔港抽样调查南海不同捕捞方式 CPUE 比较分析 陶雅晋 易木荣 李波 冯波 卢伙胜 颜云榕 (1)
- 新疆博尔塔拉河冬季鱼类群落空间分布及其与环境因子的关系 刘鸿 牛建功 刘春池 谢鹏 梁杰锋 蔡林钢 马徐发 张人铭 (11)
- 海水酸化胁迫对紫贻贝能量分配的影响 王晓芹 Samuel P.S. Rastrick 吴亚林 房景辉
杜美荣 高亚平 蔺凡 姜妮妮 李凤雪 王军威 张义涛 方建光 蒋增杰 (21)
- 桑沟湾养殖海带生长的模型预测 蔡碧莹 朱长波 刘慧 常丽荣 肖露阳 孙倩雯 蔺凡 (31)
- 水力停留时间对厌氧反应器脱氮效果的影响 王震林 朱建新 曲克明 陈世波 (42)
- 悬浮物胁迫中国对虾幼体的急性毒性研究 乔延龙 殷小亚 肖广侠 王立平 (50)
- 牙鲆 *efhd2* 和 *tbc1d25* 基因的克隆和表达分析 侯吉伦 郭亚男 付元帅 王桂兴 张晓彦 孙朝徽 司飞 王玉芬 (57)
- 银鲫 *crh* 基因的克隆、组织表达谱及其对摄食的影响 周朝伟 雷骆 邓星星 袁登越
杨旻珉 曹高祥 朱海星 李岩 朱成科 李代金 唐仁军 张桂众 李路宽 郑宗林 (69)
- 黄唇鱼消化系统组织结构及黏液细胞分布特征 赵彦花 区又君 李加儿 温久福 周慧 (80)
- 图丽鱼寄生破坏古氏虫的形态描述及系统发育 谢志胜 马江霞 杨昆明 段成任 郭爱民 岳城 (87)
- 十足目甲壳动物的 EST-SSR 分析 高海钰 李健 王佳佳 李吉涛 (94)
- 真鲷虹彩病毒自然感染杂交石斑鱼“褐龙斑”的组织病理分析 刘冉阳 史成银 谢国驷 李晨 王海波 (103)
- 饲料中添加复合芽孢杆菌对凡纳滨对虾抗病毒感染能力及抗病基因表达的影响 孙博超 杨运楷 李玉宏 宋晓玲 黄捷 (113)
- 基于 TaqMan qPCR 检测凡纳滨对虾样品中虾肝肠胞虫并样检测方法的评价 宋增磊 董宣 赵若恒 王秀华 武和英 于党辉 谢国驷 黄捷 (122)
- 用于水生病原菌的 3 种高通量活菌计数方法的比较 邹培卓 杨倩 董宣 谢国驷 黄捷 (133)
- 江蓠、浒苔、藻渣和菌渣替代鱼粉对红鳍东方鲀幼鱼生长性能、相关生化指标的影响 郭斌 梁萌青 徐后国 卫育良 张庆功 李本相 廖章斌 (141)
- 雌雄条纹锯鲷肌肉营养成分的比较与评价 赵亭亭 陈超 邵彦翔 (151)
- 5 种海藻在刺参幼参饲料中的应用研究 王晓艳 乔洪金 黄炳山 王成强 李培玉 李宝山 王际英 (160)
- 不同光质及胁迫处理对鼠尾藻及附生藻类光合生理的影响 袁艳敏 刘福利 梁洲瑞 汪文俊 孙修涛 (168)
- 研究综述
- 微塑料在海洋渔业水域中的污染现状及其生物效应研究进展 夏斌 杜雨珊 赵信国 朱琳 陈碧鹃 孙雪梅 曲克明 (178)

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

CONTENTS

Vol.40 No.3 June 2019

- Comparative Analysis of CPUE of Different Fishing Types in the South China Sea Based on the Fishing Port Sampling Survey TAO Yajin, YI Murong, LI Bo, FENG Bo, LU Huosheng, YAN Yunrong (1)
- Spatial Distribution of the Fish Community and Its Relationship with Environmental Factors in the Bortala River in Winter LIU Hong, NIU Jiangong, LIU Chunchi, XIE Peng, LIANG Jiefeng, CAI Lingang, MA Xufa, ZHANG Renming (11)
- Impact of Seawater Acidification on the Energy Budget of *Mytilus galloprovincialis* WANG Xiaoqin, Samuel P.S. Rastrick, WU Yalin, FANG Jinghui, DU Meirong, GAO Yaping, LIN Fan, JIANG Weiwei, LI Fengxue, WANG Junwei, ZHANG Yitao, FANG Jianguang, JIANG Zengjie (21)
- Model Simulated Growth of Kelp *Saccharina japonica* in Sanggou Bay CAI Biying, ZHU Changbo, LIU Hui, CHANG Lirong, XIAO Luyang, SUN Qianwen, LIN Fan (31)
- The Impact of Hydraulic Retention Time on an Anaerobic Reactor's Nitrogen Removal Effect WANG Zhenlin, ZHU Jianxin, QU Keming, CHEN Shibo (42)
- Acute Toxicity Effects of Suspended Solids Stress on *Fenneropenaeus chinensis* Larvae QIAO Yanlong, YIN Xiaoya, XIAO Guangxia, WANG Liping (50)
- Cloning and Expression Analysis of *efhd2* and *tbc1d25* Gene in Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) HOU Jilun, GUO Yanan, FU Yuanshuai, WANG Guixing, ZHANG Xiaoyan, SUN Zhaohui, SI Fei, WANG Yufen (57)
- Cloning, Tissue Expression Profiling, Functional Characterization of Corticotropin-Releasing Hormone (*crh*) on Feeding in Gibel Carp (*Carassius auratus gibelio*) ZHOU Chaowei, LEI Luo, DENG Xingxing, YUAN Dengyue, YANG Minmin, CAO Gaoxiang, ZHU Haixing, LI Yan, ZHU Chengke, LI Daijin, TANG Renjun, ZHANG Guizhong, LI Lukuan, ZHENG Zonglin (69)
- Histology and Distribution of Mucous Cells in Digestive System of *Bahaba flavolabiata* ZHAO Yanhua, OU Youjun, LI Jiaer, WEN Jiufu, ZHOU Hui (80)
- Morphological Description and Molecular Phylogeny of the *Gussevius asota* Parasite on *Astronotus ocellatus* XIE Zhisheng, MA Jiangxia, YANG Kunming, DUAN Chengren, GUO Aimin, YUE Cheng (87)
- Analysis of SSR Information in EST Resource of Decapod Crustaceans GAO Haiyu, LI Jian, WANG Jiajia, LI Jitao (94)
- Histopathology of Hybrid Grouper (*Epinephelus bruneus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂) Naturally Infected with Red Seabream Iridovirus (RSIV) LIU Ranyang, SHI Chengyin, XIE Guosi, LI Chen, WANG Haibo (103)
- Effects of Single or Mixed *Bacillus* on WSSV Infection and Immune-Related Gene Expression in *Litopenaeus vannamei* SUN Bochao, YANG Yunkai, LI Yuhong, SONG Xiaoling, HUANG Jie (113)
- Evaluation on the Detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* in Pooled DNA Samples of *Litopenaeus vannamei* Based on TaqMan qPCR SONG Zenglei, DONG Xuan, ZHAO Ruoheng, WANG Xiuhua, WU Heying, YU Danghui, XIE Guosi, HUANG Jie (122)
- Comparison of Three High-Throughput Viable Counting Techniques for Aquatic Pathogenic Bacteria ZOU Peizhuo, YANG Qian, DONG Xuan, XIE Guosi, HUANG Jie (133)
- Effects of *Gracilaria verrucosa*, *Enteromorpha prolifera*, Algae Residue and Fungi Residue on Growth Performance, and Related Biochemical Indices of Juvenile *Takifugu rubripes* GUO Bin, LIANG Mengqing, XU Houguo, WEI Yuliang, ZHANG Qinggong, LI Benxiang, LIAO Zhangbin (141)
- Comparison and Evaluation of Nutritional Components in the Muscle of Male and Female *Centropristis striata* ZHAO Tingting, CHEN Chao, SHAO Yanxiang (151)
- Application Research of Five Seaweeds in Juvenile Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) WANG Xiaoyan, QIAO Hongjin, HUANG Bingshan, WANG Chengqiang, LI Peiyu, LI Baoshan, WANG Jiyang (160)
- Effects of Different Light Quality and Stress Treatments on Photosynthetic Efficiencies and Physiological Characteristics of *Sargassum thunbergii* and Epiphyllous Algae YUAN Yanmin, LIU Fuli, LIANG Zhourui, WANG Wenjun, SUN Xiutao (168)
- Research Progress on Microplastics Pollution in Marine Fishery Water and Their Biological Effects XIA Bin, DU Yushan, ZHAO Xinguo, ZHU Lin, CHEN Bijuan, SUN Xuemei, QU Keming (178)

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180118001

http://www.yykxjz.cn/

陶雅晋, 易木荣, 李波, 冯波, 卢伙胜, 颜云榕. 基于渔港抽样调查南海不同捕捞方式 CPUE 比较分析. 渔业科学进展, 2019, 40(3): 01–10

Tao YJ, Yi MR, Li B, Feng B, Lu HS, Yan YR. Comparative analysis of CPUE of different fishing types in the South China Sea based on the fishing port sampling survey. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(3): 01–10

基于渔港抽样调查南海不同捕捞方式 CPUE 比较分析*



陶雅晋¹ 易木荣¹ 李波¹ 冯波^{1,2,3,4} 卢伙胜^{1,2,3} 颜云榕^{1,2,3,4}①

(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;
3. 广东省南海深远海渔业管理与捕捞工程技术研究中心 湛江 524088;
4. 广东海洋大学深圳研究院海洋渔业信息化技术化中心 深圳 518000)

摘要 本研究基于 2016 年对南海三省区的 14 个沿海主要渔港的连续 4 个季节抽样调查(共计 5256 航次, 抽样总功率达到 89.2×10^4 kW), 以 $\text{kg} \cdot \text{kW}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 作为 CPUE(Catch per unit effort, 单位捕捞努力量渔获量)标准化后的单位, 对南海 9 种捕捞作业类型渔船的 CPUE 进行了比较分析。结果显示, $\text{CPUE}_{\text{围网}} > \text{CPUE}_{\text{双拖}} > \text{CPUE}_{\text{刺网}} > \text{CPUE}_{\text{罩网}} > \text{CPUE}_{\text{张网}} > \text{CPUE}_{\text{单拖}} > \text{CPUE}_{\text{虾拖}} > \text{CPUE}_{\text{笼壶}} > \text{CPUE}_{\text{钓具}}$ 。不同捕捞作业类型 CPUE 随渔船功率段的变化而不同, CPUE 峰值数及其所对应的最优功率段(渔获率最高的功率段)也有差异, 单拖和虾拖渔船的 CPUE 随渔船功率的变化具有 1 个 CPUE 峰值点, 最优功率段分别为(200~250) kW($\text{CPUE}=8.6 \text{ kg} \cdot \text{kW}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)和(150~200) kW($\text{CPUE}=5.0 \text{ kg} \cdot \text{kW}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$); 围网、双拖、钓具和刺网渔船的 CPUE 随渔船功率的变化有 2 个 CPUE 峰值点, 对应的最优功率段分别为(200~250) kW($\text{CPUE}=47.7 \text{ kg} \cdot \text{kW}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、(350~400) kW($\text{CPUE}=16.8 \text{ kg} \cdot \text{kW}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、(50~100) kW($\text{CPUE}=2.9 \text{ kg} \cdot \text{kW}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)和(0~50) kW($\text{CPUE}=6.9 \text{ kg} \cdot \text{kW}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。罩网渔船 CPUE 随功率段变化有 3 个峰值点, 最优功率段为(0~50) kW($\text{CPUE}=7.0 \text{ kg} \cdot \text{kW}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。不同捕捞作业类型 CPUE 季节变化表现: 围网 CPUE 均值在春季最高, 单拖、双拖、罩网、钓具和笼壶在夏季最高, 张网在秋季最高, 刺网和虾拖在冬季最高。

关键词 渔港抽样调查; 捕捞作业类型; CPUE; 最优功率段

中图分类号 S932 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)03-0001-10

南海捕捞渔船数量众多、燃油成本过高、捕捞不合理等现象导致了渔业资源过度开发、能源利用率过低、产能过剩等问题。近年来, 南海捕捞生产重心也逐步从追求产量转变为海洋渔业资源的可持续开发

(黄俊秀等, 2017)。CPUE(Catch per unit effort, 单位捕捞努力量渔获量)常用于渔业资源丰度的评估(朱国平等, 2016; 袁兴伟等, 2014), 是进行渔获率比较、渔具差异分析和捕捞方式合理性分析的重要指标。开展对

* 国家自然科学基金项目(41376158)和广东省教育厅南海深远海渔业资源评估与监测(2014GKXM048)共同资助 [This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (41376158), and Assessment and Monitoring of Deep Sea Fisheries Resources in the South China Sea, Guangdong Provincial Education Department (2014GKXM048)] 陶雅晋, E-mail: 1129230184@qq.com

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

收稿日期: 2018-01-18, 收修改稿日期: 2018-04-14

不同捕捞方式 CPUE 的研究,是加强南海渔船管理和制定相关政策的前提,它既是科学问题,也是应用问题。但因不同捕捞方式 CPUE 的单位不统一,难以通过多种渔业 CPUE 来实现整个海域渔业资源丰度的评估,以及不同捕捞方式渔获率的比较。对此,首先需要解决不同捕捞方式之间 CPUE 单位标准化问题。

CPUE 单位标准化首先要考虑捕捞努力量单位统一问题。莫苑敏等(2014)研究指出,使用单船每千瓦天(kW·d)估算产量可以平抑不同渔船之间由于渔况、天气、渔船性能和渔民技术熟练程度等造成的产量差异,明显缩小各层内的样本方差;联合国粮农组织(FAO)也推荐采用渔船总吨数与时间的乘积(GT·d、GT·h)或发动机功率与捕捞作业天数乘积(kW·d)来表示捕捞努力量(张胜茂等, 2014; Stamatopoulos, 2002)。在确定了捕捞努力量计算方法后,国外, Ulman 等(2016)将 $\text{kg}\cdot\text{kW}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 作为 CPUE 统一单位,对土耳其具有代表性的围网和拖网 2 种渔业方式的渔获率进行统计,进而研究分析了土耳其 1967~2010 年整体渔业资源和总捕捞努力量的变动情况。国内,王学锋等(2008)和邹建伟等(2016a, b)将 $\text{kg}\cdot\text{kW}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 作为渔获率统计方法分别统计了 2008 年南海北部拖网和 2016 年伏季休渔时期北部湾主要捕捞方式的渔获组成情况。传统 CPUE 因受到单位不统一的限制,难以作为衡量整个捕捞海域资源丰度的指标,目前,很多学者对南海渔业方面的研究局限于生物多样性(李渊等, 2016)、群落结构(王雪辉等, 2013)、声学评估(张立等, 2016)、渔船组成(郑彤等, 2016)等方面,对南海海域不同捕捞方式 CPUE 比较方面的研究仍是空白。

本研究是在确定 CPUE 单位标准化表示形式 $\text{kg}\cdot\text{kW}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 基础上,通过对 2016 年 4 个季节南海三省区渔船生产数据的整理、计算与分析,比较了南海 9 种主要捕捞方式 CPUE 随季节和渔船功率的变化情况。研究结果反映了南海不同捕捞方式之间渔获率及其捕捞能力差异,以期对南海海洋捕捞结构调整与渔业生产统计等方面提供一定的参考价值。

1 材料与方法

1.1 数据来源

广东海洋大学南海渔业资源监测与评估中心利用广东、广西、海南三省(区)在北部湾登记作业的渔船数据库,从中提取全部拖网渔船信息形成总体抽样母体,然后对南海三省渔船按功率段进行分层并在各层内随机抽取样本渔船,抽查渔船尽量包括所有作业种类的各种功率段。调查时间为 2016 年的春、夏、秋、

冬共 4 个季节(1 年数据),冬季调查时间:1 月 20 日~2 月 26 日;春季调查时间:3 月 18 日~4 月 30 日;夏季调查时间:8 月 8~31 日(8 月 8~15 日处于休渔期,期间主要调查钓渔船的生产数据);秋季调查时间:9 月 1 日~11 月 21 日。调查渔港为南海区三省的各个主要沿海渔港(图 1)。

1.2 调查航次与抽样功率统计

南海渔船样本容量大,随机抽取 1% 有代表性的样本数已具有统计的可信性,抽查的渔船尽可能包括所有捕捞类型的各功率段,以保证抽样具有足够的代表性。本研究采用分层随机抽样法,结合抽样原理,将不同捕捞类型的渔船功率区间分为 5 段(表 1),再在每一段中分别随机抽样,最后进行统计汇总分析(甘喜萍等, 2008)。2016 年全年调查的渔船中,单拖渔船、双拖渔船、虾拖渔船、围网渔船、罩网渔船、刺网渔船、钓渔船、笼壶渔船以及张网船对应的调查总航次分别为 580、335、487、545、678、1989、407、174 和 61 航次,对应的抽样总功率分别为 81400、120702、125341、98101、120403、282124、57439、5613 和 986 kW。春、夏、秋、冬 4 个季节分别对应的调查航次数据和抽样功率数据见表 2。

调查内容包括渔船的主机功率、作业天数、作业海域、船员数、渔获种类与产量等,大部分数据来自渔船各个季节的销售结算单或是船上的生产记录本,从而保证调查数据的真实性、可靠性与完整性。

1.3 数据处理

将汇总的表格收集整理,并进行统计处理与分析。首先,对录入表格的原始数据进行核查,矫正错漏。调查时比较难得到渔船的准确功率,只有渔船号是准确无误的,统计之前通过渔船数据库,利用渔船号进行核对与更正,如数据库不存在的,以现场核定主机功率为准。然后对调查数据预处理,包括计算不同种捕捞类型渔船的航次作业天数、单船航次的渔获量、CPUE 等及其 95% 的置信区间。绘图软件采用 OriginPro 2017 和 ArcMap 10.2。

CPUE 表达式:

$$\text{CPUE} = \frac{\text{捕捞总产量}(C)}{\text{渔船主机功率}(E) \times \text{作业天数}(D)}$$

式中,捕捞总产量单位为千克(kg);渔船主机功率单位为千瓦(kW);作业天数单位为天(d)。此单位值的计算路径:某渔船以 kg 为单位的总产量除以获取产量的作业天数与渔船以 kW 为单位的主机功率乘积之商。所述总产量是指某捕捞渔船捕获的不以价

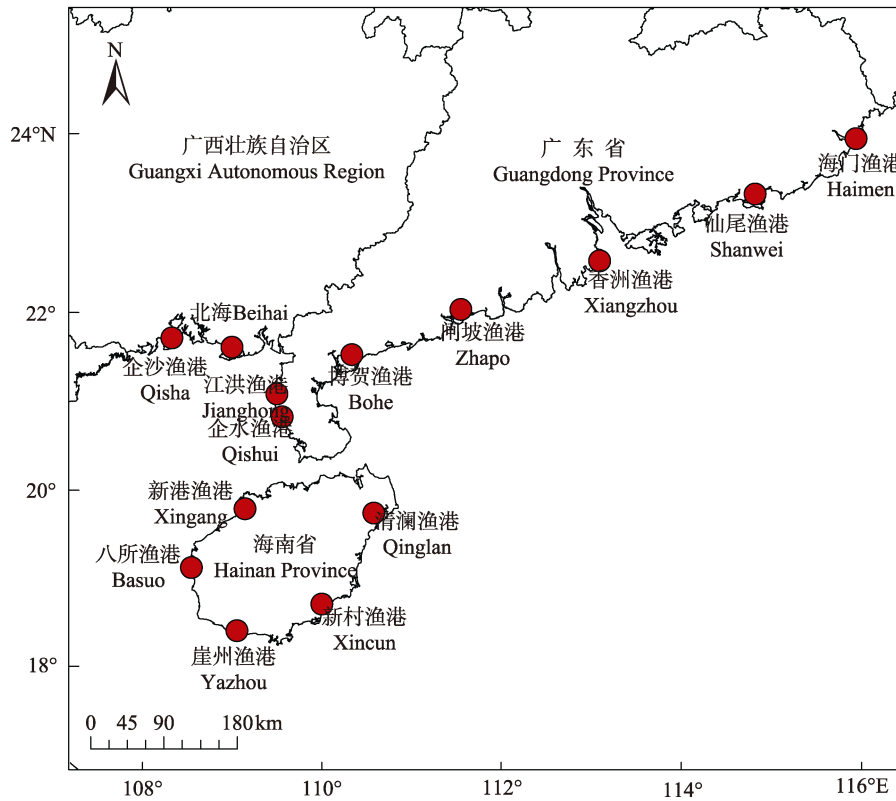


图 1 调查渔港分布

Fig.1 Distribution of fishing ports

表 1 渔船抽样功率分层情况

Tab.1 Stratification for sampling fishing power

作业类型 Fishing types	功率段 Power (kW)					
单拖 Otter trawl	0~100	100~200	200~300	300~400	>400	
双拖 Pair trawl	0~100	100~200	200~300	300~400	>400	
虾拖 Shrimp trawl	0~100	100~200	200~300	300~400	>400	
围网 Seine	0~50	50~100	100~200	200~300	>300	
罩网 Falling-net	0~50	50~100	100~200	200~300	>300	
刺网 Gillnet	0~50	50~100	100~150	150~200	>200	
钓具 Fishing tackle	0~50	50~100	100~150	150~200	>200	
笼壶 Pot	0~50	50~100	100~150	150~200	>200	
张网 Stow net	0~50	50~100	100~150	150~200	>200	

值为取向的所有种类的总质量。所述作业天数是指某捕捞渔船扣除停港、航行、避风时间后以天为整数的捕获总产量的所有时间的总和, 包含航次内作业周期期间的间歇和故障处理时间。所述主机功率是指某捕捞渔船驱动航行动力的总功率。

2 结果

2.1 不同捕捞方式 CPUE 随渔船功率的变化

不同捕捞方式渔船的 CPUE 随功率变化的表现形式不同, CPUE 均值的最大值所处的功率水平也不

同(图 2): 单拖渔船 CPUE 均值的最大值为 $14.1 \text{ kg}\cdot\text{kW}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ($E=235 \text{ kW}$); 双拖渔船 CPUE 均值的最大值为 $16.8 \text{ kg}\cdot\text{kW}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ($E=376 \text{ kW}$); 虾拖船 CPUE 均值的最大值为 $5.3 \text{ kg}\cdot\text{kW}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ($E=155 \text{ kW}$); 刺网渔船 CPUE 均值的最大值为 $15.0 \text{ kg}\cdot\text{kW}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ($E=8 \text{ kW}$); 钓渔船 CPUE 均值的最大值为 $6.2 \text{ kg}\cdot\text{kW}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ($E=44 \text{ kW}$); 围网渔船 CPUE 均值的最大值为 $57.3 \text{ kg}\cdot\text{kW}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ($E=242 \text{ kW}$); 罩网渔船 CPUE 均值的最大值为 $11.6 \text{ kg}\cdot\text{kW}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ($E=245 \text{ kW}$); 笼壶渔船 CPUE 均值的最大值为 $5.3 \text{ kg}\cdot\text{kW}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ($E=8 \text{ kW}$)。渔船功率增大到一定程度时, 渔船的 CPUE 均随着功率增大而呈现下降趋势。

表2 抽样调查航次与功率统计
Tab.2 Statistics of voyage and power of sampling survey

作业类型 Fishing types	春季 Spring		夏季 Summer		秋季 Autumn		冬季 Winter	
	调查航次 Voyage	抽样功率 Power	调查航次 Voyage	抽样功率 Power	调查航次 Voyage	抽样功率 Power	调查航次 Voyage	抽样功率 Power
单拖 Otter trawl	145	18480	245	34753	117	15897	73	12269
双拖 Twin trawl	29	14957	89	30420	131	36046	86	39279
虾拖 Shrimp trawl	49	21074	103	16352	169	46264	166	41650
罩网 Falling-net	206	35310	60	10695	118	26903	161	25192
围网 Seine	254	37485	205	30980	93	26003	126	25936
刺网 Gillnet	492	91911	407	56186	457	49349	633	84678
钓具 Fishing tackle	136	19523	79	11307	112	9855	80	16755
笼壶 Pot	37	306	76	820	41	4359	20	128
张网 Stow net	13	210	13	210	9	146	26	420
合计 Total	1,361	239256	1,277	191723	1247	214823	1371	246307

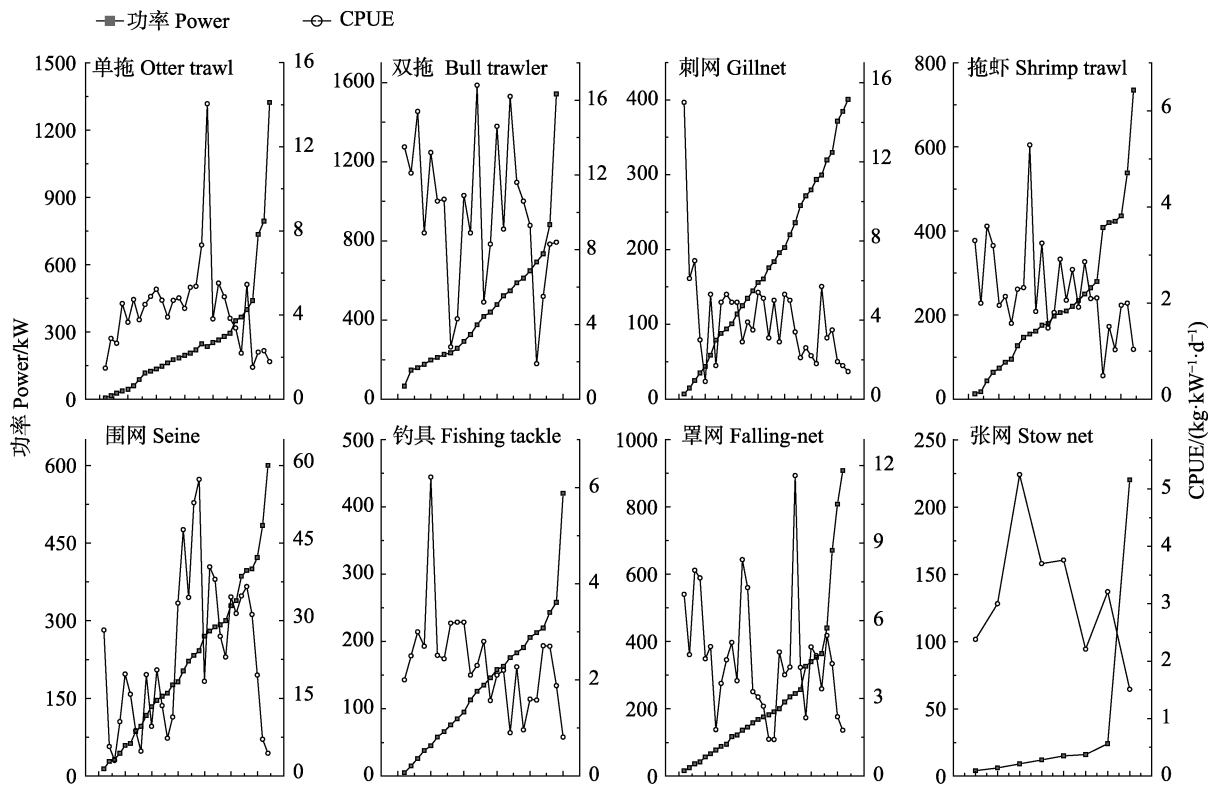


图2 渔船 CPUE 随功率的变化
Fig.2 CPUE changes with fishing power

单拖、双拖、虾拖、刺网、钓具、罩网、围网、笼壶和张网9种捕捞方式全年CPUE均值对应大小依次为3.95、8.77、3.11、4.96、2.35、4.81、29.57、3.08和4.73 $\text{kg}\cdot\text{kW}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ，比较它们之间的大小关系为： $\text{CPUE}_{\text{围网}} > \text{CPUE}_{\text{双拖}} > \text{CPUE}_{\text{刺网}} > \text{CPUE}_{\text{罩网}} > \text{CPUE}_{\text{张网}} > \text{CPUE}_{\text{单拖}} > \text{CPUE}_{\text{虾拖}} > \text{CPUE}_{\text{笼壶}} > \text{CPUE}_{\text{钓具}}$ （张网和笼壶因调查到的渔船功率分布有缺陷，本研究只作CPUE

均值的比较）。

2.2 不同捕捞方式 CPUE 对比分析

通过分层抽样调查数据的基础上，再按照每50 kW功率段对不同的捕捞方式分组，并计算CPUE的平均值，分析比较不同功率段CPUE均值的变化趋势。对拖网类渔船（包括单拖渔船、双拖渔船和虾拖渔船）比

较(图 3), 单拖渔船和虾拖渔船随渔船功率的增加, CPUE 均值变化表现为先增大后减小趋势。单拖渔船 CPUE 均值的最优功率段(渔获率最高的功率段)为(200~250) kW(CPUE=8.6 kg·kW⁻¹·d⁻¹), 虾拖渔船 CPUE 最优功率段为(150~200) kW(CPUE=5.1 kg·kW⁻¹·d⁻¹); 双拖渔船 CPUE 均值随功率段的增加呈现先减小后增大再减小的变化趋势, 对应的 2 个峰值点区间分别位于(50~100) kW(CPUE=16.0 kg·kW⁻¹·d⁻¹)和(350~400) kW (CPUE=16.8 kg·kW⁻¹·d⁻¹), 最优功率段为(350~400] kW。同一功率段水平比较三者的 CPUE 均

值大小关系为 CPUE_{双拖}>CPUE_{单拖}>CPUE_{虾拖}。

刺网和钓渔船的 CPUE 随着功率段的增加, 整体均呈现先减小后增大再减小的变化趋势(图 4), 刺网渔船的 2 个峰值功率段为(0~50) kW (CPUE=6.9 kg·kW⁻¹·d⁻¹)和(300~350) kW(CPUE=5.2 kg·kW⁻¹·d⁻¹), 最优功率段为(0~50) kW; 钓渔船对应的 2 个峰值功率段为(0~50) kW(CPUE=2.9 kg/(kW·d))和(200~250) kW (CPUE=2.5 kg·kW⁻¹·d⁻¹), 最优功率段为(0~50) kW。同一功率段水平比较二者的 CPUE 均值大小关系为 CPUE_{刺网}>CPUE_{钓具}。

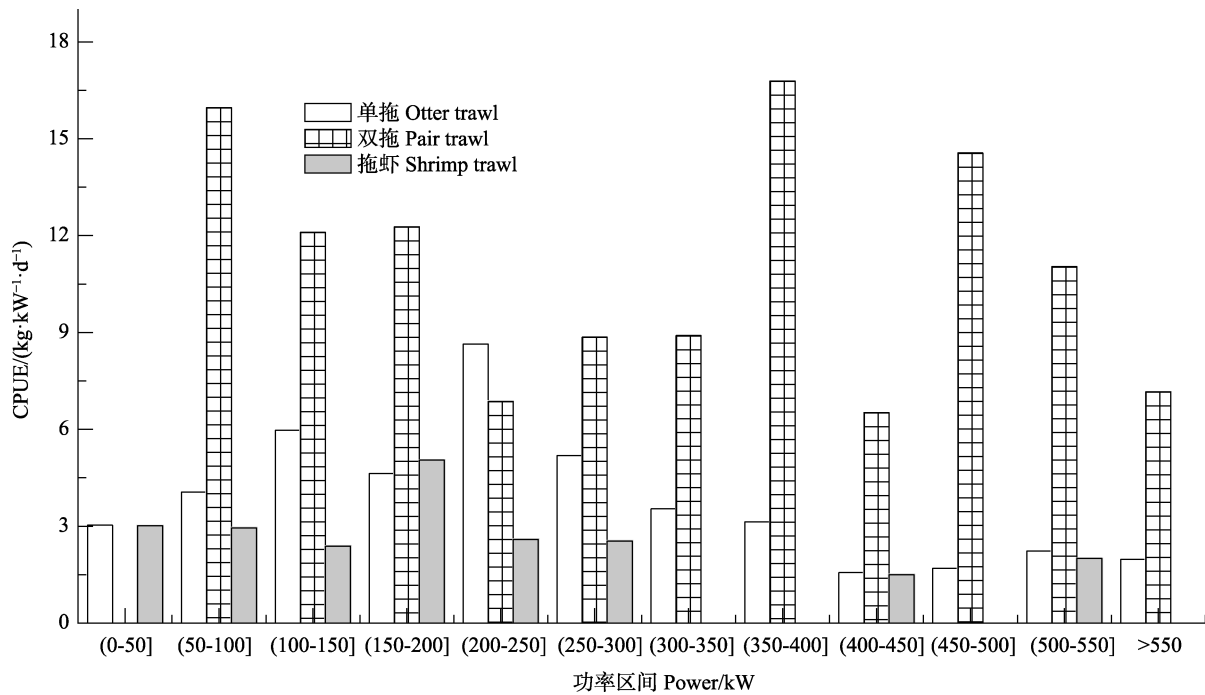


图3 拖网类渔船 CPUE 随功率的变化

Fig.3 Variation of CPUE versus trawl's power

围网渔船 CPUE 均值随功率段的增加呈现出先减小后增大再减小的变化趋势(图 4), 对应的 2 个峰值分别位于(0~50) kW(CPUE=24.6 kg·kW⁻¹·d⁻¹)和(200~250) kW(CPUE=47.7 kg·kW⁻¹·d⁻¹)功率段, 最优功率段为(200~250) kW; 罩网渔船 CPUE 随渔船功率的变化具有 3 个峰值点, 对应的功率段分别于(0~50) kW (CPUE=7.0 kg·kW⁻¹·d⁻¹), (100~150) kW (CPUE=6.2 kg·kW⁻¹·d⁻¹)和(200~250)kW (CPUE=4.7 kg·kW⁻¹·d⁻¹), 最优功率段为(0~50) kW。同一功率段水平比较二者的 CPUE 均值大小关系为 CPUE_{围网}>CPUE_{罩网}。

2.3 不同捕捞方式 CPUE 随季节的变化

单拖渔船 CPUE 季节变化趋势, 夏季最高(CPUE=4.42 kg·kW⁻¹·d⁻¹), 秋季次之(CPUE=4.02 kg·kW⁻¹·d⁻¹),

冬季最低(CPUE=2.82 kg·kW⁻¹·d⁻¹), 即 CPUE 季节变化趋势为 CPUE_夏>CPUE_秋>CPUE_春>CPUE_冬; 双拖渔船春、夏、秋、冬 4 个季节的 CPUE 均值变化依次为 CPUE_夏>CPUE_秋>CPUE_冬>CPUE_春; 虾拖渔船 CPUE 均值变化为 CPUE_冬>CPUE_秋>CPUE_夏>CPUE_春; 罩网渔船 CPUE 均值变化为 CPUE_夏>CPUE_春>CPUE_秋>CPUE_冬; 刺网渔船 CPUE 均值变化依次为 CPUE_冬>CPUE_秋>CPUE_春>CPUE_夏; 钓渔船 CPUE 均值变化依次为 CPUE_夏>CPUE_春>CPUE_秋>CPUE_冬; 笼壶渔船 CPUE 均值变化依次为 CPUE_夏>CPUE_冬>CPUE_春>CPUE_秋; 张网渔船 CPUE 均值变化依次为 CPUE_秋>CPUE_夏>CPUE_春>CPUE_冬; 围网渔船 CPUE 均值变化依次为 CPUE_春>CPUE_冬>CPUE_秋>CPUE_夏。

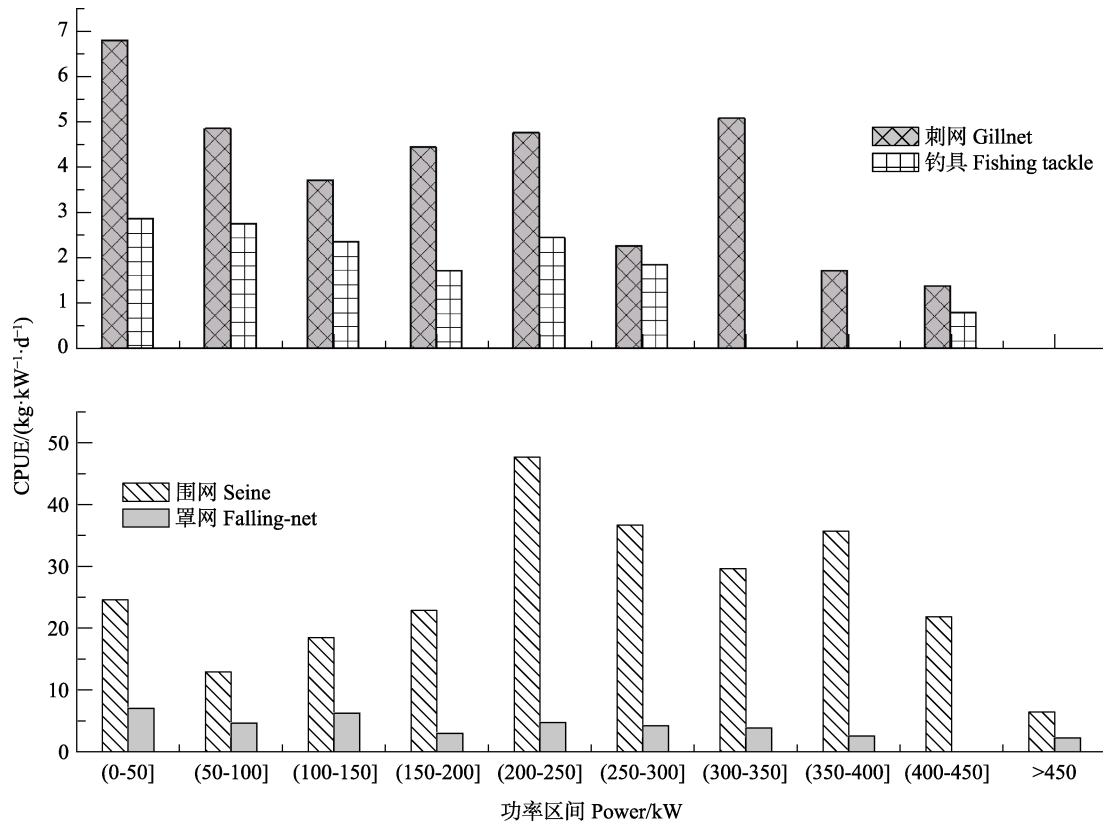


图4 刺网、钓具、罩网和围网 CPUE 随功率的变化趋势

Fig.4 Variation of CPUE of gillnet, fishing tackle, seine and falling-net versus power change

3 讨论

3.1 不同捕捞方式 CPUE 随渔船功率的变化

不同捕捞方式 CPUE 均值随功率段的变化趋势不同,对应的最优功率段也不一样。其中,CPUE 随着渔船功率段的变化只有 1 个峰值的捕捞方式为单拖和虾拖,二者都是凭借渔船主机的能动性来拖动网具快速移动而迫使捕捞对象进入网囊的捕捞类型。随着主机功率增大,拖动网口的周长越长或网具数量越多、拖速越快,捕捞能力也会越强,但因受到捕捞海域资源量或是资源分布不均匀的限制,主机功率的过度增大反而导致其 CPUE 不增反减(周应祺等, 2000); 双拖、围网、钓具和刺网等 CPUE 随着渔船功率段变化均具有 2 个峰值。第 1 个峰值对应功率段均为各自最小的功率段,分析此现象的原因,小功率渔船可以近海海域进行短时间作业,渔船油耗低,同时受到资源量的限制作用较小,导致其 CPUE 较高。第 2 个峰值同样位于渔船功率增大到一定程度时,其对资源的捕捞能力与所捕捞海域资源量限制水平所达到了最大平衡;罩网渔船 CPUE 随着渔船功率变化具有 3 个峰值,最小峰值处同样对应渔船的最小功率段,捕捞特征多为家庭式作业方式。对于罩网渔船 CPUE 的第

2 峰值和第 3 峰值所处功率段的原因,本研究暂无法给出明确解释,猜测原因是分别受到近海和外海不同资源量水平限制的结果,对于 250 kW 以上的罩网渔船,其船体大小已具有足够存储空间,并具备长时间作业和渔获物冷冻冷藏能力。

在本研究中,不同捕捞方式 CPUE 对应的最优功率段不一样,最优功率段对应的渔船功率水平也不相同,这主要是由不同捕捞方式各自的捕捞特征以及捕捞对象的资源量水平所共同决定的。

3.2 不同捕捞方式 CPUE 随季节的变化

不同捕捞方式的 CPUE 在 4 个季节的变化趋势不同(图 5),具体表现:围网的 CPUE 在春季最高,单拖、双拖、罩网、钓具和笼壶在夏季最高,张网在秋季最高,刺网和虾拖在冬季最高。分析其原因,一方面是与不同捕捞类型渔船的作业方式有关,另一方面也与作业渔场的环境变化有关。

王增焕等(2005)曾利用初级生产力估算南海北部渔业资源量的季节差异,提出南海北部渔业资源量有明显的季节差异,以夏季资源量最高,冬季次之,春季最低;张俊等(2015)利用声学对南沙南部陆架海域渔业资源评估,提出夏季的数量密度和资源量密度

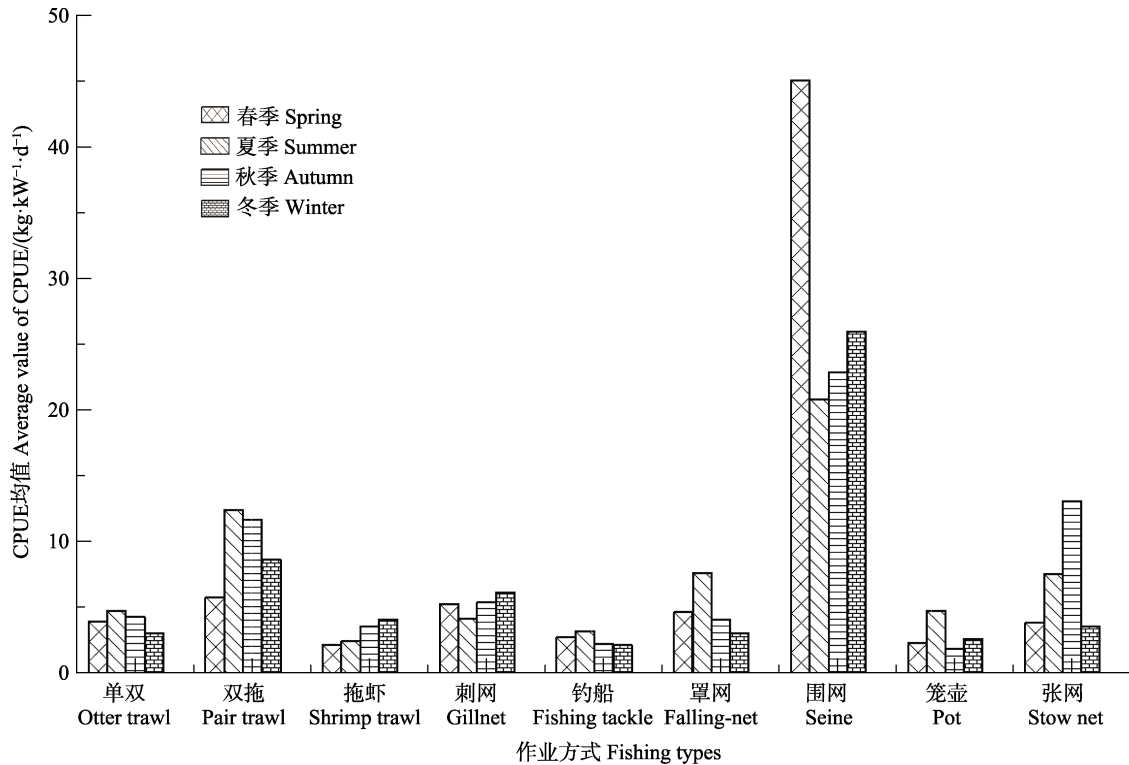


图 5 不同捕捞方式之间的 CPUE 季节变化
Fig.5 CPUE quarterly changes with different fishing types

在 4 个季节中均最高,可以用来解释本研究中大部分捕捞类型(包括单拖、罩网、钓具和笼壶等)夏季 CPUE 值最高的原因。资料显示,汕头—台浅围网渔场(粤东渔场与台湾浅滩渔场部分交集海域)汛期为 1~5 月(杨乾亚等, 1994); 珠江口围网渔场汛期主要为春汛(12 月至翌年 4 月), 旺汛期为 2~3 月; 粤西及海南岛东北部渔场海域围网作业的渔汛期为 12 月至翌年 4 月; 北部湾北部渔场围网作业的渔汛期为 10 月至翌年 4 月。这些资料为本研究中围网 CPUE 春季最高的原因给予了充分解释。对张网在南海海域作业的渔获量的季节变化研究较少, 陈鸿兰(2015)在 2013~2014 年对琼州海峡海域张网渔获组成进行研究, 提出张网渔获种类 Margalef 丰富度指数(D')和 Shannon-Wiener 多样性指数(H')均在秋季达到最大值, 春季最小, 间接表明南海张网作业在秋季渔获量较高, 其 CPUE 值相对较高。刺网 CPUE 在冬季最高, 可能是受到冬季洄游影响, 使得刺网在洄游水域的通道上可以拦截更多的渔获物。

3.3 不同捕捞方式 CPUE 大小比较

CPUE 单位标准化的表达形式, 表述的意思是单位每千瓦天的产量。从经济学角度来讲, CPUE 表述的是产量产出与资本投入和劳力投入之间的比值关

系, 在相同投入条件下, 可以通过不同捕捞方式之间 CPUE 的大小比较来反映它们捕捞能力的大小。对 2016 年不同捕捞方式 CPUE 均值比较发现, 围网船渔船的 CPUE 最高, 其次为双拖渔船和刺网渔船, 笼壶和钓具的 CPUE 最小。分析其原因, 主要由不同捕捞方式具有不同的作业原理、作业特征和捕捞对象所致。

邹建伟等(2016a)在 2015 年北部湾北部沿岸夏季休渔效果评价中, 对桁杆拖网、灯光罩网、刺网、钓具、笼壶等作业方式的捕捞努力量($\text{kW}\cdot\text{d}$)和捕捞产量(kg)等进行统计, 基于此数据计算 CPUE 的值依次为 2.88、2.65、3.55、0.82、4.58 $\text{kg}\cdot\text{kW}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$; 本研究对 2016 年南海夏季渔获率统计, 桁杆虾拖、罩网、刺网、钓具、笼壶 CPUE 均值依次为 2.30、7.08、3.84、3.02、4.42 $\text{kg}\cdot\text{kW}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 与北部湾的 CPUE 均值比较, 除了桁杆虾拖和笼壶作业方式的 CPUE 均值相近, 南海海域其他捕捞方式的渔获率普遍比北部湾海域要高。分析其原因, 主要是由于北部湾近岸经常受高强度捕捞(付奕奕, 2012), 导致北部湾近岸渔业资源量比南海整个海域的平均资源量低。黄俊秀等(2016)对广西拖网渔船的渔获率时空变动统计, 显示渔获率最高的渔区是南海北部渔区, 达 5.02 $\text{kg}\cdot\text{kW}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 其次是湾口外渔区(4.88 $\text{kg}\cdot\text{kW}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、南海外海渔区(4.46 $\text{kg}\cdot\text{kW}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、北部湾渔区(2.75 $\text{kg}\cdot\text{kW}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), 并

指出拖网渔获率是评价渔业资源状况的一个重要指标,间接表明北部湾渔区渔业资源量要低于南海海域资源量的平均水平。

3.4 不同捕捞方式捕捞结构调整建议

“十三五”期间,进一步加强国内海洋渔船数和渔船功率控制(简称“双控”)。近年来,南海捕捞生产重心也逐步从追求产量转变为海洋渔业资源的可持续开发(黄俊秀等,2016),针对渔船数量和渔船功率调整方面,需要了解渔船的结构组成与捕捞能力情况。根据在调查中发现的问题,结合本研究中不同捕捞方式 CPUE 峰值随渔船功率变化的结果,提出以下建议:

在调查中发现,其渔船数量占整个南海海域渔船组成的比例最大,占 9 种捕捞方式调查总航次的 37.8%(表 2),尤其是小型流刺网,数量庞大,且主要集中在北部大陆架区域资源已普遍衰退的地带(郑彤等,2016),结合本研究刺网渔船第 2 峰值功率段(图 4),建议重点压减南海三省区小型刺网渔船的数量,适当保留或改造成 200~350 kW 的刺网渔船;减少破坏海底生态环境的拖网类作业类型,限制最优功率段 200 kW 以下的单拖渔船的规模,严厉打击南海的电拖网作业,并逐步淘汰那些老旧、木质、高耗能、污染大的单拖和双拖渔船;针对南海海域的灯光罩网渔船,多数小型灯光罩网渔船为其他小型渔船改造而来(张鹏等,2013),政府应出台相应政策禁止其随意改造,并减少近海大功率罩网渔船的作业,鼓励向南沙海域或其他深远海海域对尚未开发的鳶乌贼(*Symplectoteuthis oualaniensis*)资源进行探捕;鉴于灯光围网渔船 CPUE 均值最高、选择性好的特点,应考虑对其限制规模适当发展(郑彤等,2016),但同时也建议对第 3 峰值 400 kW 以上渔船的数量进行限制,避免其强光对渔业资源尤其对幼鱼带来永久性伤害;钓具 CPUE 虽然较低(全年 CPUE 均值仅为 $2.35 \text{ kg} \cdot \text{kW}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),但其不受海底地形限制,可以适当引导和发展其第 2 峰值 200~250 kW 或以上的大型钓渔船,向深远海和岩礁深水域捕捞高价值鱼种。

参 考 文 献

Chen HL. Catch composition and effects on fishery resources of stow net in Qiongzhou Strait. Master's Thesis of Guangdong Ocean University, 2015, 11–12 [陈鸿兰. 琼州海峡海域张网渔获组成及其对渔业资源的影响. 广东海洋大学硕士研究生学位论文, 2015, 11–12]

Fu YY. Studies on food web structure and energy flows of

offshore ecosystem, Guangxi. Master's Thesis of Xiamen University, 2012, 5–6 [付奕奕. 广西近海生态系统食物网结构及能量流动研究. 厦门大学硕士研究生学位论文, 2012, 5–6]

Gan XP, Lu HS, Feng B, *et al.* Application of stratified sampling in fishery production statistics. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2008, 36(20): 8401–8402 [甘喜萍, 卢伙胜, 冯波, 等. 分层抽样法应用于渔业生产统计的研究. *安徽农业科学*, 2008, 36(20): 8401–8402]

Huang JX, Zou JW, Wang QZ, *et al.* Study on structure of catches of marine fishing of Guangxi in 2016. *Chinese Fisheries Economics*, 2017, 35(6): 18–22 [黄俊秀, 邹建伟, 王强哲, 等. 2016 年广西海洋捕捞产量结构研究. *中国渔业经济*, 2017, 35(6): 18–22]

Li Y, Zhang J, Zhang R, *et al.* Fish diversity in southwestern seas of Nansha Islands and the mouth of Beibu Bay. *Biodiversity Science*, 2016, 24(2): 166–174 [李渊, 张静, 张然, 等. 南沙群岛西南部和北部湾口海域鱼类物种多样性. *生物多样性*, 2016, 24(2): 166–174]

Mo YM, Gong C, Feng B, *et al.* Estimation of trawler catch in Beibu Gulf by stratified sampling. *Modern Fisheries Information*, 2014, 29(3): 211–214 [莫苑敏, 龚超, 冯波, 等. 应用分层抽样技术估计北部湾底拖网渔业产量. *渔业信息与战略*, 2014, 29(3): 211–214]

Stamatopoulos C. Sample-based fishery surveys. A technical handbook. FAO Fishery Technical Paper, Rome: FAO, 2002(425): 1–132

Ulman A, Pauly D. Making history count: The shifting baselines of Turkish fisheries. *Fisheries Research*, 2016, 183: 74–79

Wang XF, Feng B, Lu HS. Catch composition and species diversity of the bottom trawl fishery in the northern South China Sea in 2008. *Fishery Modernization*, 2010, 37(1): 47–59 [王学锋, 冯波, 卢伙胜. 2008 年南海北部拖网渔获组成及其多样性分析. *渔业现代化*, 2010, 37(1): 47–59]

Wang XH, Lin ZJ, Du FY, *et al.* Fish species composition and community pattern in the continental shelf of northwestern South China Sea. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(7): 2225–2235 [王雪辉, 林昭进, 杜飞雁, 等. 南海西北部陆架区鱼类的种类组成与群落格局. *生态学报*, 2013, 33(7): 2225–2235]

Wang ZH, Li CH, Jia XP. The fishery production from the north part of the South China Sea using the primary production method. *Marine Fisheries Research*, 2005, 26(3): 9–15 [王增焕, 李纯厚, 贾晓平. 应用初级生产力估算南海北部的渔业资源量. *海洋水产研究*, 2005, 26(3): 9–15]

Yang QY, Ling XW. Analysis of spring fishing season of the light seine in Shantou - Taiwan bank fishing ground, 1993. *Jiangxi Fishery Sciences and Technology*, 1994(1): 4–6

- [杨乾亚, 林贤武. 汕头——台浅渔场 1993 年春汛灯光围网渔汛分析. 江西水产科技, 1994(1): 4–6]
- Yuan XW, Yan LP, Liu ZL, *et al.* A performance comparison of stock density estimation of *Larimichthys polyactis* in the East China Sea using different models based on bottom trawl survey. *South China Fisheries Science*, 2014, 10(6): 20–26 [袁兴伟, 严利平, 刘尊雷, 等. 基于底拖网调查的东海区小黄鱼资源密度不同估算方法差异比较. 南方水产科学, 2014, 10(6): 20–26]
- Zhang J, Chen GB, Chen ZZ, *et al.* Acoustic estimation of fishery resources in southern continental shelf of Nansha area. *South China Fisheries Science*, 2015, 11(5): 1–10 [张俊, 陈国宝, 陈作志, 等. 南沙南部陆架海域渔业资源声学评估. 南方水产科学, 2015, 11(5): 1–10]
- Zhang L, Li Y, Lin LS, *et al.* Fishery resources acoustic assessment of major economic species in south-central of the South China Sea. *Marine Fisheries*, 2016, 38(6): 577–587 [张立, 李渊, 林龙山, 等. 南海中南部主要经济种类渔业资源声学评估. 海洋渔业, 2016, 38(6): 577–587]
- Zhang P, Zeng XG, Yang L, *et al.* Analyses on fishing ground and catch composition of large-scale light falling-net fisheries in South China Sea. *South China Fisheries Science*, 2013, 9(3): 74–79 [张鹏, 曾晓光, 杨吝, 等. 南海区大型灯光罩网渔场渔期和渔获组成分析. 南方水产科学, 2013, 9(3): 74–79]
- Zhang SM, Yang SL, Dai Y, *et al.* Algorithm of fishing effort extraction in trawling based on Beidou vessel monitoring system data. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(8): 1190–1199 [张胜茂, 杨胜龙, 戴阳, 等. 北斗船位数据提取拖网捕捞努力量算法研究. 水产学报, 2014, 38(8): 1190–1199]
- Zheng T, Tang Y. Analysis of current status of Chinese marine fishing fleet of South China Sea area. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2016, 25(4): 620–627 [郑彤, 唐议. 我国南海区海洋捕捞渔船现状分析. 上海海洋大学学报, 2016, 25(4): 620–627]
- Zhou YQ, Chen XJ, Zhang XG. Study on the measurement of fishing capacity in Chinese fisheries. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2000, 9(2): 119–124 [周应祺, 陈新军, 张相国. 有关捕捞能力量化统计方法的探讨. 上海海洋大学学报, 2000, 9(2): 119–124]
- Zhu GP, Wang R. Catch per unit effort of Antarctic krill (*Euphausia superba*) fishery and its suitability to abundance estimation. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(7): 1072–1079 [朱国平, 王芮. 南极磷虾渔业 CPUE 及其丰度估算适用性. 水产学报, 2016, 40(7): 1072–1079]
- Zou JW, Huang JX, Wang QZ. Assessment on achievements of summer fishing moratorium in coastal fishing grounds in northern Beibu Gulf, 2015. *Fishery Information and Strategy*, 2016a, 31(2): 132–138 [邹建伟, 黄俊秀, 王强哲. 北部湾北部沿岸渔场 2015 年伏季休渔效果评价. 渔业信息与战略, 2016a, 31(2): 132–138]
- Zou JW, Wang QZ, Huang JX, *et al.* Assessment on achievements of summer fishing moratorium in the continental shelf of northern south China Sea, 2016. *Fisheries Science and Technology Information*, 2016b, 43(6): 318–323 [邹建伟, 王强哲, 黄俊秀, 等. 南海北部大陆架渔场 2016 年伏季休渔效果评价. 水产科技情报, 2016b, 43(6): 318–323]

(编辑 冯小花)

Comparative Analysis of CPUE of Different Fishing Types in the South China Sea Based on the Fishing Port Sampling Survey

TAO Yajin¹, YI Murong¹, LI Bo¹, FENG Bo^{1,2,3,4}, LU Huosheng^{1,2,3}, YAN Yunrong^{1,2,3,4}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; 3. Guangdong Provincial Engineering and Technology Research Center of Far Sea Fisheries Management and Fishing of South China Sea, Zhanjiang 524088; 4. Shenzhen Institute of Guangdong Ocean University, Marine Fisheries Information Technique of South China Sea, Shenzhen 518000)

Abstract Catch Per Unit Effort (CPUE) was commonly used to assess fishery resource abundance. The assessment results can be narrow when using a single special fishing type to assess the whole sea resource density due to complexity and specificity of species. In this study, kg/(kW·d) was used as the standardized unit of CPUE to analyze and compare the catch rates of different fishing types in the South China Sea. Data were collected by the investigations of fishing vessels in 14 major fishing ports of the 3 provinces and autonomous regions of Guangdong, Guangxi and Hainan in 2016. Total of 5256 voyages, 892,109 kW of the fishing vessels were sampled and investigated. The results showed that nine fishing types' catching rate (CPUE) were ranked as seine > pair trawl > gillnet > falling-net > stow net > otter trawl > shrimp trawl > pot > fishing tackle. The changing trend of different fishing types' CPUE were different with the power level of main engine. And the number of CPUE peaks and their corresponding optimal range (the highest rate of capture of the power range) were not the same, specific performances: Variation of CPUE of otter trawl and shrimp trawl showed one peak with the trend of rising first and declining later, corresponding optimal ranges of (200~250) kW (CPUE=8.6 kg·kW⁻¹·d⁻¹) and (150~200) kW (CPUE=5.0 kg·kW⁻¹·d⁻¹) for otter trawl and shrimp trawl respectively. Two peaks of variation were showed on CPUE of seine, pair trawl trawler, fishing tackle and gillnet, with the trend of first to decline then rise and last decline, corresponding optimal range: (200~250) kW (CPUE=47.7 kg·kW⁻¹·d⁻¹) for seine, (350~400) kW (CPUE=16.8 kg·kW⁻¹·d⁻¹) for pair trawl, (50~100) (CPUE=2.9 kg·kW⁻¹·d⁻¹) for fishing tackle, (0~50) kW (CPUE=6.9 kg·kW⁻¹·d⁻¹) for gillnet. Three peaks of variation were shown on CPUE of falling-net, corresponding optimal range was (0~50) kW (CPUE=7.0 kg·kW⁻¹·d⁻¹). Seasonal variation of CPUE of different fishing types performed as the mean CPUE of seine was the highest in spring, CPUE of otter trawl, pair trawl, falling-net, fishing tackle and pot were highest in summer, CPUE of stow net were highest in autumn, CPUE of gillnet and shrimp trawl were highest in the winter.

Key words Fishing port sampling survey; Fishing types; CPUE; Optimal range

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180404001

http://www.yykxjz.cn/

刘鸿, 牛建功, 刘春池, 谢鹏, 梁杰锋, 蔡林钢, 马徐发, 张人铭. 新疆博尔塔拉河冬季鱼类群落空间分布及其与环境因子的关系. 渔业科学进展, 2019, 40(3): 11–20

Liu H, Niu JG, Liu CC, Xie P, Liang JF, Cai LG, Ma XF, Zhang RM. Spatial distribution of the fish community and its relationship with environmental factors in the Bortala River in winter. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(3): 11–20

新疆博尔塔拉河冬季鱼类群落空间分布 及其与环境因子的关系*



刘 鸿¹ 牛建功¹ 刘春池¹ 谢 鹏²
梁杰锋² 蔡林钢¹ 马徐发² 张人铭^{1①}

(1. 新疆维吾尔自治区水产科学研究所 农业农村部西北地区渔业资源环境科学观测实验站 乌鲁木齐 830000;
2. 华中农业大学 武汉 430000)

摘要 为完善新疆博尔塔拉河流域的渔业生态评估及体系养护, 2016 年 11 月在博尔塔拉河流域展开资源调查, 于干流设置 4 个监测断面, 对该水域鱼类群落结构进行研究。本调查共采集鱼类 1515 尾, 隶属于 3 目 5 科 14 属, 共计 15 种, 均为硬骨鱼类; 通过相对重要性指数(IRI 指数)获得的博尔塔拉河干流的鱼类优势种共计 3 种, 分别为麦穗鱼(*Pseudorasbora parva*)、棒花鱼(*Abbottina rivularis*)和新疆高原鳅(*Triplophysa strauchii*)。基于 Bray-Curtis 相似性指数的二维聚类分析结果显示, 在 60%相似水平上空间聚类, 可将博尔塔拉河分为上游及下游 2 组, 物种聚类在 50%相似水平上可分为 I-IV 共计 4 组。典范对应分析(CCA)表明, 影响冬季鱼类群落空间结构的主要环境因子为海拔、温度和溶氧。对照历史资料结果表明, 博尔塔拉河流域的土著鱼类种类减少; 外来鱼类种类逐年增加; 经济鱼种减少; 鱼类群落小型化明显。本研究可为该流域生态环境评估、水资源开发利用及渔业资源养护提供基础数据, 具有一定的参考价值。

关键词 鱼类; 群落结构; 环境因子; 博尔塔拉河

中图分类号 S932.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2019)03-0011-10

博尔塔拉河是中国新疆博尔塔拉蒙古自治州的一条内流河, 发源于阿拉套山与别珍套山交界处的洪林达坂(苏宏超等, 2006), 地理位置介于 44°02'N~45°23'N、79°53'E~83°53'E 之间(卡米拉, 2004), 全长 252 km, 面积约 12506 km², 系一条常年流水河。博尔塔拉河北部主要支流为哈拉吐鲁克河和保尔得河, 南部主要支流仅鄂托克赛尔河(蔡林钢等, 2009)。博尔塔拉河自西向东依次流经温泉县、博乐市和精河县, 最后注

入艾比湖(朱永生等, 2010)。

鱼类群落是特定水域内鱼类种群相互结合的结构单元, 即鱼类与周围环境及其他物种相互依赖、相互作用、具有特定功能的生物复合体(叶富良, 2002; 李捷等, 2010)。鱼类是水生生态系统的高级消费者, 其群落的演替过程能够反映栖息地环境条件的变动。历史上对于博尔塔拉河的研究主要涉及环境评价(张兆永等, 2015; 摆晓虎等, 2017)、径流量(董煜等,

* 国家自然科学基金(31702348)资助 [This work was supported by National Natural Science Fund (31702348)]. 刘 鸿, E-mail: lhallbymyself@163.com

① 通讯作者: 张人铭, 研究员, E-mail: xj01zrm@163.com

收稿日期: 2018-04-04, 收修改稿日期: 2018-05-02

2014)、气候(古丽吉米丽·艾尼, 2012)及土壤(比拉力等, 2014)等方面, 关于水生生物的研究较少, 冬季水生生物群落结构未见报道。据记载, 博尔塔拉河土著鱼类数量较少, 受气候持续干旱和人类活动等因素的影响, 该流域鱼类群落结构演替明显(蔡林钢等, 2009)。博尔塔拉河由高山溶雪补充水源, 冬季水量充沛, 部分高山鱼类随雪山融水进入河道, 对该流域冬季鱼类资源状况的调查能够较好反映部分土著鱼类的种群数量及空间分布(李国刚等, 2017)。

博尔塔拉河春夏季鱼类群落已有报道, 缺少冬季数据, 故本研究定位于冬季群落结构, 基于冬季数据, 拟通过博尔塔拉河冬季鱼类资源调查数据, 并结合历史资料分析其种群结构、空间格局以及环境相关性, 为该流域生态环境评估、水资源开发利用及渔业资源养护提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 断面设置

本次调查按照等间距原则设置监测断面。即自上游到下游分别于呼鲁斯托汗系日格、祖莫墩、哈日乌

勒以及夏日勒津设置 4 个调查断面, 依次为 S1、S2、S3 和 S4 (图 1), 调查时间为 2016 年 11 月。

1.2 样品采集及分析

由于调查河段均属于可涉水河流, 为全面采集各个水层鱼类, 渔获物捕捞采用挂网(20 m × 2 m)和地笼(5 m × 0.3 m × 0.3 m)结合的方法, 各调查断面均使用地笼 5 个, 挂网 2 片。各采样断面均平行设置 2 个站点进行采集, 各断面作业时间均覆盖全天 24 h, 以消除昼夜节律影响。对所采集的渔获物分别进行种类鉴别、体长和体重记录等, 测量数据现场记录, 部分种类样品使用福尔马林固定后带回实验室分析并保存。标本鉴定及分类依据《中国动物志: 硬骨鱼纲鲤形目(中卷、下卷)》(陈宜瑜, 1998、2000)、《青藏高原鱼类》(武云飞等, 1992)和《新疆鱼类志》(中国科学院动物研究所, 1979; 郭焱等, 2012)。

使用 WTW Multi 3630 IDS 水质分析仪测定环境因子, 测定内容包括溶解氧(DO)、pH、电导率(Res)和水温(T); 使用 Garmin Orenon 550 测量海拔及经纬度; 使用测距仪测量河道宽; 使用 SVR 雷达枪测量流速。

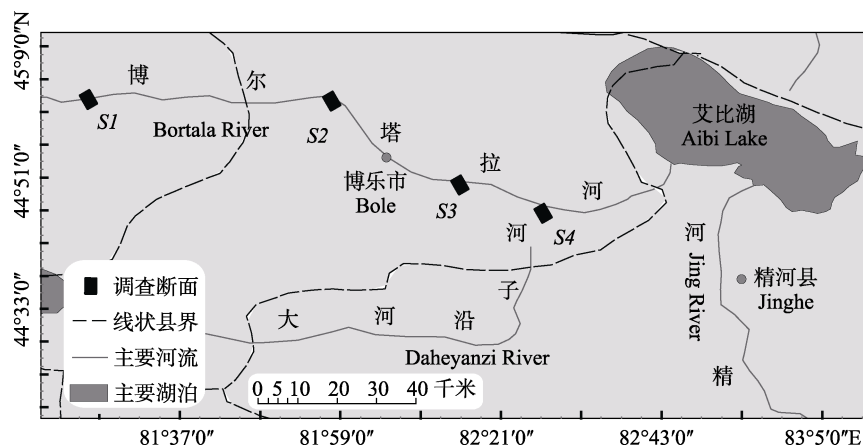


图 1 博尔塔拉河调查断面示意图

Fig.1 Sampling sections in mainstream of Bortala River, Xinjiang

1.3 数据处理

用 Margalef 的种类丰富度指数 D 、香农-威纳(Shannon-Wiener)多样性指数 H' 以及 Pielou 均匀度指数 J 分析鱼类群落的物种多样性(毛志刚等, 2011)。由于鱼类不同种类及同种类个体间差异很大, Wilhm (1968)提出, 用生物量表示的多样性更接近种类间能量的分布, 因此, 本研究中根据生物量计算群落物种多样性。其计算公式如下:

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

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

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

式中, S 为种类数, W 为总渔获量(g), P_i 为第 i 种鱼所占总渔获量的比例。

选用 Pinkas 的相对重要性指数(IRI)判断各资源种类优势种(Young *et al*, 1998), 相对重要性指数包含生物的个体数、生物量和出现频率三方面的重要信息,

常被用作研究群落种类的生态优势度(刘鸿等, 2017; 孙鹏飞等, 2015; 杨尧尧等, 2016), 其计算公式如下:

$$IRI = (N + W) \times F$$

式中, N 为某一数量的数量占总数量的百分比(%); W 为某一数量的质量占总质量的百分比(%); F 为某一数量出现的站数占调查总站数的百分比(%)。IRI 值大于 1000 定为优势种, 100~1000 为重要种, 10~100 的为常见种, 小于 10 为罕见种(Shan *et al.*, 2011)。

Bray-Curtis 相似性矩阵(Bray *et al.*, 1957)能够较科学地反应生物群落之间的差异性, 基于该指数的聚类分析是研究鱼类空间聚集类型的主要方法(Chambers *et al.*, 2005)。相似性分析之前对原始数据进行 $\log(x+1)$ 变换, 以便对稀有种给予不同程度的加权(周红等, 2003)。

典范对应分析(Canonical correspondence analysis, CCA)(Braak, 1986、1987)是将 CA/RA 和多元回归结合起来的排序方法, 其每一步计算结果都与环境因子进行回归, 进而详细研究物种与环境的关系, 其结合多个环境因子更好地反映群落与环境的关系, 其分析结果可将样方、种类以环境因子排序综合表示, 可更直观地分析群落结构(张金屯, 2011)。其结果一般是将种类、样方和环境因子绘制在一张排序图, 环境因子用带箭头实线表示, 箭头所处象限表示环境因子与排序轴间的正负相关性, 箭头连线的长度代表某个环境因子与群落分布和种类分布之间相关程度的大小, 连线越长相关性越大; 反之越小。连线与排序轴的夹角代表着某个环境因子与排序轴的相关性大小, 夹角越小, 相关性越高, 反之越低(张金屯, 2011)。

数据分析前使用流量对数据进行标准化,

$$D = \text{尾数} / F_v \times T \times H$$

式中, D 为资源密度, F_v 为流速(m/s), T 为时间, H 为水深(m)。

采用 ArcGIS 10.2 绘制调查断面分布图, 底图来源于 ArcGIS-Esri 中国, 坐标系为 GCS_WGS_1984, 多样性指数图使用 Origin 9.1 绘制。运用 Primer 5.1 统计软件进行空间聚类分析。CCA 分析前使用 Pearson 显著性检验对环境因子进行筛选, 后通过 R3.4.2 vegan package 实现, 三序图采用 2 (species)型标尺, 即样方坐标等比例于相对特征根(Borcard *et al.*, 2014)。

2 结果与分析

2.1 鱼类群落种类组成

2016年11月博尔塔拉河调查共采集鱼类1515尾, 共计15种, 隶属于3目5科14属, 均为硬骨鱼类, 其

中以鲤形目鱼类最多, 共计12种, 占总种类数的85.71%; 鲤形目以鲤科鱼类为主, 共计9种, 其余均为鳅科鱼类。鲈形目共计出现2种, 分别为黄魮(*Hypseleotris swinhonis*)和波氏栉虾虎鱼(*Ctenogobius cliffordpopei*)。鲢形目仅出现1种, 即青鲢(*Oryzias latipes*) (表1)。

2.2 群落物种多样性及优势种

分析博尔塔拉河鱼类群落物种多样性指数(图2), 结果显示, 博尔塔拉河上游 S1 断面 Shannon-Wiener 指数最高, S2 断面最低。而 S1~S3 断面丰富度指数差异较小, 下游 S4 断面最高。S2 断面 Pielou 均匀度指数仅为 0.59, 而调查河段上游 S1 断面均匀度指数最高, 为 0.95。

相对重要性指数 IRI 分析结果显示, 博尔塔拉河优势种共 3 种, 即麦穗鱼(*Pseudorasbora parva*)、棒花鱼(*Abbottina rivularis*) 和新疆高原鳅(*Triplophysa strauchii*)。其中, 麦穗鱼和棒花鱼于 4 个断面均有采集到样品, 而新疆高原鳅仅在 S1 和 S2 断面出现, 数量在该断面占绝对优势(图3)。鲫(*Carassius auratus*)、波氏栉虾虎鱼、黄魮和短尾鳊(*Phoxinus brachyurus*) 为重要种, 其中, 黄魮于 4 个断面均有出现, 但数量较少。斯氏高原鳅(*Triplophysa stoliczkae*)、中华鲮鱼(*Rhodeus sinensis*)和青鲢在博尔塔拉河占比较低, 均仅出现于 1 个调查断面, 系罕见种。由此可见, 博尔塔拉河鱼类群落已演化为以外来鱼种为主导的结构。

2.3 群落空间格局及其与环境因子的关系

博尔塔拉河鱼类群落二维聚类分析结果见图3。在 60%相似水平上空间聚类可将博尔塔拉河分为 Group1 和 Group2 两组, 前者为博尔塔拉河上游, 即 S1 和 S2 断面, 后者为博尔塔拉河下游, 即 S3 和 S4 断面。物种聚类在 50%相似水平上可分为 4 组, Group I 包括无须魮(*Acheilognathus gracilis*)、黄魮、麦穗鱼、波氏栉虾虎鱼和棒花鱼 5 种, 其中, 麦穗鱼和波氏栉虾虎鱼空间分布相似水平最高, 达 90%。Group II 仅包括斯氏高原鳅和北方泥鳅(*Cobitis granoci*) 2 种, 主要分布于博尔塔拉河中游。Group III 包括新疆裸重唇鱼(*Gymnodiptychus dybowskii*)、新疆高原鳅和短尾鳊 3 种。Group IV 共有鱼类 5 种, 分别为青鲢、准噶尔雅罗鱼(*Leuciscus merzbacheri*)、鲮(*Hemiculter leucisculus*)、中华鲮鱼和鲫。该组鱼类主要分布于 Group2 (图3)。

Pearson 显著性检验结果显示, 海拔(Altitude)、温度和溶解氧(DO)为主要影响博尔塔拉河鱼类群落结构的环境参数。使用以上 3 个环境因子进行典范对

表1 2016年博尔塔拉河调查冬季鱼类名录
Tab.1 The fish species in Bortala River in winter during 2016

目 Order	科 Family	属 Genus	种 Species	类别 Category			
				BRNS	BRAS	XJAS	NRAS
鲮形目 Cyprinodontiformes	鲮科 Cyprinodontidae	青鲮属 <i>Oryzias</i>	青鲮 <i>O. latipes</i>				✓
鲤形目 Cypriniformes	鲤科 Cyprinidae	棒花鱼属 <i>Abbottina</i>	棒花鱼 <i>A. rivularis</i>		✓		
		鲮属 <i>Hemiculter</i>	鲮 <i>H. leucisculus</i>				✓
		鲮属 <i>Phoxinus</i>	短尾鲮 <i>P. brachyurus</i>	✓			
		鲫属 <i>Carassius</i>	鲫 <i>C. auratus</i>			✓	
		裸重唇鱼属 <i>Gymnodiptychus</i>	新疆裸重唇鱼 <i>G. dybowskii</i>	✓			
		麦穗鱼属 <i>Pseudorasbora</i>	麦穗鱼 <i>P. parva</i>			✓	
		鳊鲂属 <i>Rhodeus</i>	中华鳊鲂 <i>R. sinensis</i>				✓
		雅罗鱼属 <i>Leuciscus</i>	准噶尔雅罗鱼 <i>L. merzbacheri</i>	✓			
		鲮属 <i>Acheilognathus</i>	无须鲮 <i>A. gracilis</i>				✓
	鳅科 Cobitidae	高原鳅属 <i>Triplophysa</i>	斯氏高原鳅 <i>T. stoliczkae</i>	✓			
			新疆高原鳅 <i>T. strauchii</i>	✓			
		花鳅属 <i>Cobitis</i>	北方泥鳅 <i>C. granoci</i>				✓
鲈形目 Perciformes	塘鳢科 Eleotridae	黄魮属 <i>Hypseleotris</i>	黄魮 <i>H. swinhonis</i>				✓
	虾虎鱼科 Gobiidae	虾虎鱼属 <i>Ctenogobius</i>	波氏栉虾虎鱼 <i>C. cliffordpopei</i>				✓

注: BRNS: 博尔塔拉河土著鱼类; BRAS: 博尔塔拉河记录的外来种; XJAS: 新疆记录但博尔塔拉河无记录的外来种; NRAS: 新外来种, 新疆无记录

Note: BRNS: Native species in Bortala River; BRAS: Alien species in Bortala River; XJAS: Alien species in Xinjiang; NRAS: New record alien species

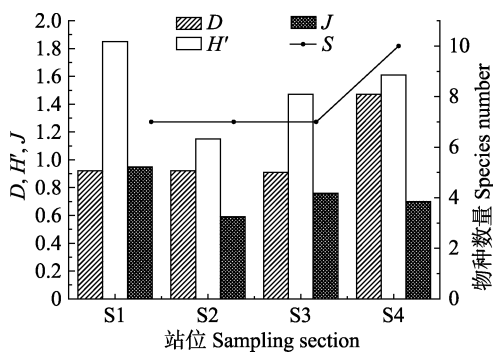


图2 博尔塔拉河鱼类群落物种多样性指数

Fig.2 The value of Shannon-Wiener (H'), richness index (D), species evenness (J), and species number of fish communities in the Bortala River, Xinjiang

应分析(CCA)。结果显示, 第1排序轴解释比例为63.90%, 第2排序轴解释比例为21.93%, 而第3排序轴解释比例仅为14.16%, 前两轴累计解释贡献率达85.84%(表3), 即前2轴可用以表征排序结果。

CCA排序结果见图4, 溶氧和海拔与第1排序轴正相关, 而温度与之负相关; 海拔和温度与第2排序轴正相关, 而溶氧与之负相关。对比发现, 海拔箭头连线最长, 温度与溶解氧次之, 表明海拔是影响博尔塔拉河鱼类群落结构的主要环境因子, 即海拔越高, 鱼类丰度越高。进一步分析显示, 斯氏高原鳅与海拔箭头连线夹角最小, 相关性最高, 即该鱼类分布主要受海拔影响; 此外, 新疆裸重唇鱼、新疆高原鳅和短尾鲮与温度正相关, 鲫与溶解氧相关性较高, 而麦穗鱼与3个环境因子均表现出较高的相关性。

3 结果与讨论

3.1 鱼类群落演化

对比历史资料发现, 博尔塔拉河鱼类群落变化较为明显, 体现在以下几方面。

土著鱼类种类减少。李思忠等(1966)对新疆北部

表 2 博尔塔拉河鱼类群落优势种
Tab.2 Dominant fish in each sampling section of Bortala River, Xinjiang

种类 Species	N	W	F (%)	IRI	类别 Category
麦穗鱼 <i>Pseudorasbora parva</i>	0.42	0.22	1	6363	优势种
新疆高原鳅 <i>Triplophysa strauchii</i>	0.31	0.43	0.5	3684	Dominant species
棒花鱼 <i>Abbottina rivularis</i>	0.11	0.12	1	2325	
鲫 <i>Carassius auratus</i>	0.03	0.14	0.5	873	重要种
波氏栉虾虎鱼 <i>Ctenogobius cliffordpopei</i>	0.08	0.01	0.75	692	Important species
黄魮 <i>Hypseleotris swinhonis</i>	0.02	0.01	1	294	
短尾鲢 <i>Phoxinus brachyurus</i>	0.01	0.04	0.25	132	
新疆裸重唇鱼 <i>Gymnodiptychus dybowskii</i>	0	0.01	0.5	56	常见种
无须鲮 <i>Acheilognathus gracilis</i>	0	0	0.5	34	Common species
北方泥鳅 <i>Cobitis granoci</i>	0	0	0.5	26	
准噶尔雅罗鱼 <i>Leuciscus merzbacheri</i>	0	0.01	0.25	23	
鲮 <i>Hemiculter leucisculus</i>	0	0	0.25	12	
斯氏高原鳅 <i>Triplophysa stoliczkae</i>	0	0	0.25	9	罕见种
中华鲮 <i>Rhodeus sinensis</i>	0	0	0.25	7	Rare species
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	0	0	0.25	6	

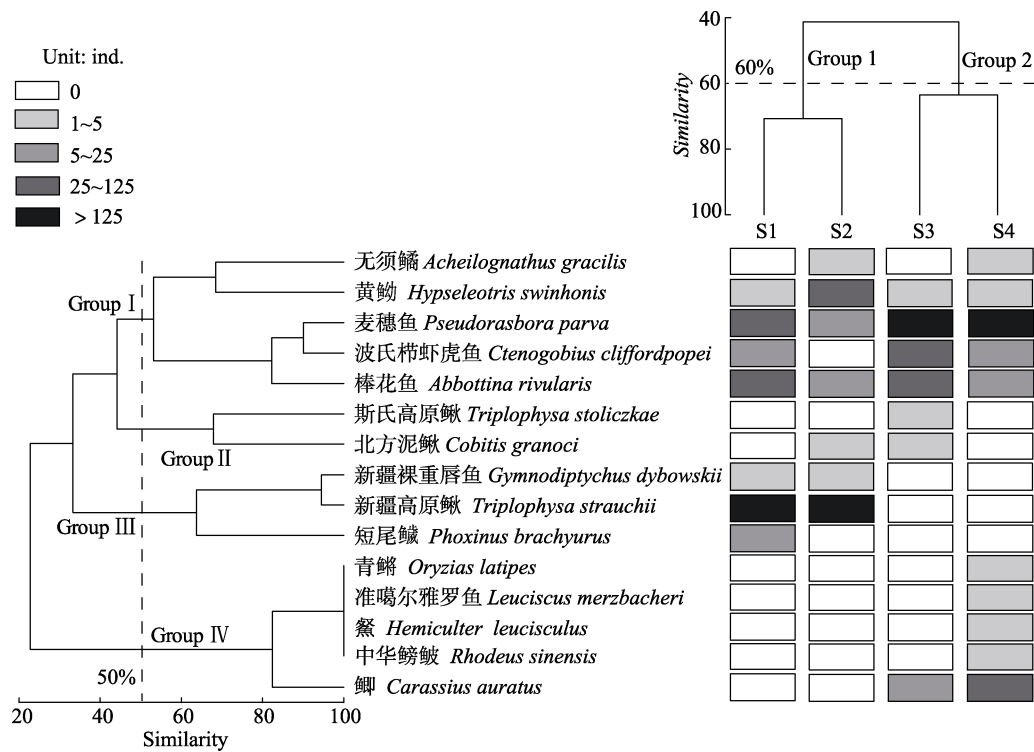


图 3 博尔塔拉河鱼类种群聚类与空间分布的关系

Fig.3 Relationship between station clusters and fish assemblages in the Bortala River, Xinjiang

表 3 博尔塔拉河各断面 CCA 排序解释变量得分及特征值
Tab.3 Eigenvalue and scores for constraining variables in each sampling section of Bortala River, Xinjiang

项目 Items	CCA1	CCA2	CCA3
溶解氧 DO (mg/L)	0.6310	-0.0853	-0.7711
温度 T (°C)	-0.6273	0.0806	0.7746
海拔 Altitude (m)	0.6731	0.5228	-0.5231
特征值 Eigenvalue	0.5057	0.1736	0.1121
解释比例 Proportion explained	0.6390	0.2193	0.1416
累计贡献率 Cumulative proportion	0.6390	0.8584	1.000

表4 新疆博尔塔拉河各采样断面环境数据
Tab.4 Environmental data in each sampling section of Bortala River, Xinjiang.

站位 Station	pH	溶解氧 DO (mg/L)	电导率 Res (Ω -m)	温度 Temp ($^{\circ}$ C)	海拔 Altitude (m)	河流宽度 River width (m)	河流流速 Flow velocity (m/s)	水深 Water depth (m)
S1	8.41	11.42	4.15	7.20	351	30	0.6	1.4
S2	8.35	12.42	2.78	5.93	411	24	0.8	0.8
S3	8.46	12.92	2.03	5.30	945	13	1.0	1.1
S4	8.25	12.64	1.37	5.67	572	15	0.8	0.6

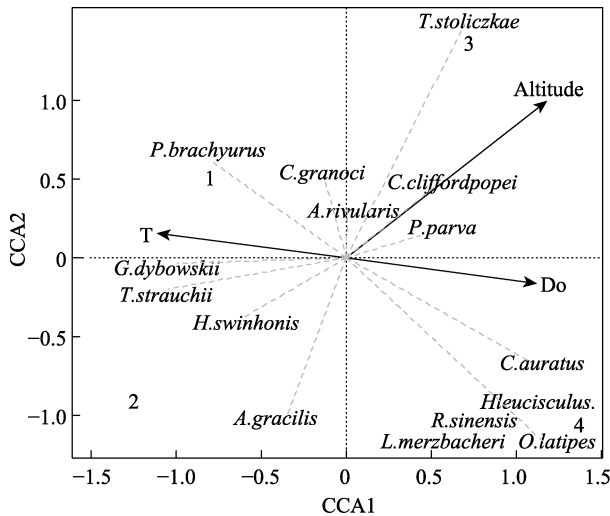


图4 博尔塔拉河 CCA 三序图(2 型标尺)

Fig.4 CCA triplot of Bortala River, Xinjiang(scaling 2)

鱼类调查结果显示,博乐水系有新疆裸重唇鱼(裸黄爪鱼)、准噶尔雅罗鱼、短尾鲢、小眼须鳅(小眼条鳅)(*Barbatula microphthalmia*)、新疆高原鳅(黑斑条鳅)、小体高原鳅(小体条鳅)(*Triplophysa minuta*)以及斯氏高原鳅(施氏条鳅)共计7种土著鱼类。2005年,蔡林钢等(2009)在对博州河流生态调查中,于博尔塔拉河仅采集到新疆裸重唇鱼、新疆高原鳅、小体高原鳅以及斯氏高原鳅4种土著鱼类。本次调查所采集到的土著鱼类包括新疆裸重唇鱼、准噶尔雅罗鱼、短尾鲢、新疆高原鳅和斯氏高原鳅5种。其中,以鳅科鱼类种类减少较为明显。

外来鱼类种类逐年增加。2005年,蔡林钢等(2009)调查中采集到的非土著鱼类主要有虹鳟(*Salvelinus gairdneri*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、鲫、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、棒花鱼以及麦穗鱼(蔡林钢等,2009),共计6种,而本次调查中采集到青鳉等10种外来鱼种(表1),麦穗鱼、棒花鱼占优较大比重,已于博尔塔拉河形成一定的种群。外来鱼种主要分布于S4断面(图3),该断面位于大河沿子河汇合口(图1),大河沿子河水温相对较高,适宜水产养殖,为博尔塔拉蒙古自治州主要养殖水系之一,大量的养殖逃逸及附带

鱼种在该断面聚集(蔡林钢等,2009;郭焱等,2012)。自20世纪60年代至今,博尔塔拉河鱼类群落已由本土著鱼类逐渐演化为外来鱼种为主土著鱼类为辅的结构,且自然河道中的外来物种种类仍在不断增加(蔡林钢等,2009)。新疆地理相对隔离,生态系统较为脆弱(韩茜,2005),外来物种天敌较少,极易对土著鱼类造成威胁,进而影响本地水生生态结构,对新疆各天然水系外来物种的风险评估及防治须予以重视。

经济鱼种减少。历史上准噶尔雅罗鱼及新疆裸重唇鱼是该流域的主要渔业对象(郭焱等,2012),尽管本次采集鱼类标本达1515尾,但准噶尔雅罗鱼及新疆裸重唇鱼均未超过10尾(表1),已难以形成渔业捕捞种群。

鱼类群落小型化。武云飞等(1992)记载,20世纪中叶新疆裸重唇鱼全长范围为110~345mm,本次调查最大全长为范围为51~132mm。短尾鲢体长范围为22~69mm,平均体长仅28mm,多以小个体为主。栖息环境的改变及过度捕捞导致性成熟提前可能是鱼类小型化的主要原因。

3.2 土著鱼类分布现状

新疆裸重唇鱼为高山冷水性经济鱼类(武云飞等,1992),为新疆分布最广泛的土著鱼类,该鱼种产卵场多位于河流上游(郭焱等,2012),近年来,受河道引水工程的影响,该鱼种已开始向各栖息地支流上游支流迁移(李国刚等,2017),本研究该鱼种也是出现于调查水域的上游。准噶尔雅罗鱼为新疆准噶尔盆地独有土著鱼类,系广温性湖泊型鱼类,准噶尔雅罗鱼应为湖泊型鱼类,受艾比湖水质盐化的影响,迫使该鱼迁栖至入湖三角洲低洼坑塘或河道之中(郭焱等,2005),主要出现于S4断面。博尔塔拉河短尾鲢分布存在出入,李思忠等(1966)与中国科学院动物研究所(1979)分别对该流域调查,均认为该河段存在短尾鲢,而蔡林钢等(2009)于2005年的调查中未采集到样品,其结合2006年天山北坡准噶尔盆地调查数据,认为准噶尔盆地可能没有短尾鲢分布。结合历史资料综合分析认为,该河段短尾鲢存在是必然的,且20世纪

中叶资源量较高, 随后种群数量逐渐下降, 故而在监测过程中未采集到样品。短尾鳊喜好生活于流速较弱的小河汉浅水区, 以倒灌流河汉最甚, 对生境相对较高的选择性限制该鱼种形成大规模种群, 而对生境的依赖性则导致该鱼种的生存容易受到影响, 进而反作用于种群, 影响其分布和种群数量。高原鳅属鱼类系高海拔小型浅水型鱼类, 无洄游习性, 分布范围相对稳定, 其中, 新疆高原鳅多分布与中上游河段, 斯氏高原鳅则多以下游为主, 鳅科鱼类繁殖能力强、经济价值低、开发利用少, 资源量相对丰富(郭焱等, 2012)。

3.3 鱼类群落与环境因子的关系

鱼类群落的空间格局除受其本身生活习性影响外, 还受环境因子空间异质性的影响(李捷等, 2012)。新疆地理环境复杂, 河流多发源于山脉, 有多种于高山产卵鱼类分布, 已知的海拔分布次序为新疆裸重唇鱼>新疆高原鳅>斯氏高原鳅>准噶尔雅罗鱼, 进而使海拔与鱼类群落结构相关性较高。此外, 斯氏高原鳅属广布种, 于新疆塔里木河、伊犁河、额敏河以及天山北坡水系均有分布(李国刚等, 2017)。S3在4个断面中海拔最高(表4), 而本次调查仅于S3断面采集到斯氏高原鳅(图3), 采样断面设置也可能对相关分析造成一定的影响。新疆裸重唇鱼、新疆高原鳅和短尾鳊主要集中于研究水域上游, 该河段距温泉县较近, 且少有支流汇入, 水温高于下游, 为适宜的越冬区, 使鱼类在该区域聚集而其余河段分布较少, 进而表现为与温度正相关。鲫主要分布于河口区, 河口区淡水注入可能使得该区域水体溶解氧含量升高。此外, 鲫为杂食性鱼类, 偏重于植物性, 喜摄食浮游植物(郭焱等, 2012), S4断面有大河沿子河注入, 夏秋季水温在20℃以上。一般而言, 温带河口区浮游生物种类丰度较高(杨宇峰等, 2006), 丰富的浮游植物能够为鲫提供充足的饵料, 使得鱼类聚集, 浮游植物的光合作用也能为水体提供较高的溶氧, 进而使得鲫与溶解氧表现为较高的相关性。其余鱼种与所测定环境因子未表现出显著相关, 这可能受到鱼类生活习性及其环境因子参数设置等多方面因素的影响, 其原因有待进一步探索。

参 考 文 献

Bai XH, Li HJ, Bai ZL. Evaluation of aquatic ecosystem health in Bortala River basin. *Environmental Protection of Xinjiang*, 2017, 39(3): 48–54 [摆晓虎, 李慧菁, 白泽龙. 博尔塔拉河流域水域生态健康评估. *新疆环境保护*, 2017, 39(3): 48–54]

Bilali, Yi M, Wang YH, *et al.* Riparian zone of lower reaches of the Bortala River. *Arid Zone Research*, 2014, 31(2): 216–221 [比拉力, 依明, 王勇辉, 等. 博尔塔拉河下游河岸带土壤养分特征及其相关性分析. *干旱区研究*, 2014, 31(2): 216–221]

Borcard D, Gillet F, Legendre P, *et al.* Lai JS (Translated by). *Numerical ecology with R*. Beijing: Higher Education Press, 2014 [博卡德, 吉莱, 勒让德, 等. 赖江山(译). *数量生态学: R语言的应用*. 北京: 高等教育出版社, 2014]

Bray JR, Curtis JT. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, 1957(27): 325–349

Braak CJFT. Correspondence analysis of incidence and abundance data: Properties in terms of a unimodal response model. *Biometrics*, 1985, 41(4): 859–873

Braak CJFT. Canonical correspondence analysis: A new eigenvector method for multivariate direct gradient analysis. *Ecology*, 1986, 67(5): 1167–1179

Cai LG, Li H, Han SW, *et al.* The river ecosystem and fish resources of Bortala Mongol Autonomous Prefecture of Xinjiang. Urumqi: Xinjiang Science and Technology Press, 2009 [蔡林钢, 李红, 韩生玮, 等. *新疆博尔塔拉蒙古自治州河流生态与鱼类资源*(第1版). 乌鲁木齐: 新疆科学技术出版社, 2009, 173]

Chambers CA, Dick TA. Trophic structure of one deep-sea benthic fish community in the Eastern Canadian Arctic: Application of food, parasites and multivariate analysis. *Environmental Biology of Fishes*, 2005, 74(3–4): 365–378

Chen YY. *Fauna Sinica, Osteichthyes, Cypriniformes II*. Beijing: Science Press, 1998 [陈宜瑜. *中国动物志 硬骨鱼纲 鲤形目*(中卷)(第1版). 北京: 科学出版社, 1998, 531]

Chen YY. *Fauna Sinica, Osteichthyes, Cypriniformes III*. Beijing: Science Press, 2000 [陈宜瑜. *中国动物志 硬骨鱼纲 鲤形目*(下卷)(第1版). 北京: 科学出版社, 2000, 661]

Dong Y, Haimiti Y, Ba Y, *et al.* Analysis on concentration and correlation of runoff and precipitation in Bortala River basin. *Journal of Water Resources & Water Engineering*. 2014, 25(4): 28–34 [董煜, 海米提·依米提, 巴音查汗, 等. 博尔塔拉河径流与降水的集中性及关联性分析. *水资源与水工程学报*, 2014, 25(4): 28–34]

Gulijimi A. Climate change in Xinjiang Bortala River basin and its effects on runoff Bortala River in recent 50 years. Master's Thesis of Xinjiang Normal University, 2012, 63 [古丽吉米丽·艾尼. 近50年博尔塔拉河流域气候变化对径流量的影响研究. 新疆师范大学硕士研究生学位论文, 2012, 63]

Guo Y, Cai LG, Zhang RM, *et al.* The native fisher distributed and made of evolution in the Yili River (China's Section). *Arid Zone Research*, 1999, 16(2): 31–35 [郭焱, 蔡林刚,

- 张人铭, 等. 伊犁河(中国境内)土著鱼类的分布与演化. 干旱区研究, 1999, 16(2): 31–35]
- Guo Y, Cai LG, Zhang RM, *et al.* Preliminary study on the biological properties of *Leuciscus merzbacheri* Zugmayer in the Sayram Lake, Xinjiang. *Arid Zone Research*, 2005, 22(2): 197–200 [郭焱, 蔡林钢, 张人铭, 吐尔逊, 张北平. 新疆赛里木湖准噶尔雅罗鱼生物学特征观测. 干旱区研究, 2005, 22(2): 197–200]
- Guo Y, Zhang RM, Cai LG, *et al.* Fauna Xinjiang. Urumqi: Xinjiang People's Publishing Press, 2012 [郭焱, 张人铭, 蔡林钢, 等. 新疆鱼类志(第 版). 乌鲁木齐: 新疆科技出版社, 2012, 220]
- Han Q. Evaluation of fragile environment and study of typical region. Master's Thesis of Xinjiang University, 2005 [韩茜. 新疆脆弱生态区评价及典型区研究. 新疆大学硕士研究生学位论文, 2005, 75]
- Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences. Fauna Xinjiang. Urumqi: Xinjiang People's Publishing Press, 1979 [中国科学院动物研究所. 新疆鱼类志(第 版). 乌鲁木齐: 新疆人民出版社, 1979, 71]
- Ka ML. The hydrological characteristics of Bortala River. Beijing: the 5th youth academic annual meeting of the China association of science and technology, 2004, 139–140 [卡米拉. 博尔塔拉河水文特性. 北京: 中国科协第五届青年学术年会, 2004, 139–140]
- Li GG, Feng CG, Tang YT, *et al.* Survey of native fish resources in inland river system in Xinjiang. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2017, 52(3): 22–27 [李国刚, 冯晨光, 汤永涛, 等. 新疆内陆河土著鱼类资源调查. 甘肃农业大学学报, 2017, 52(3): 22–27]
- Li J, Li XH, Jia XP, *et al.* Evolvement and diversity of fish community in Xijiang River. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(2): 298–311 [李捷, 李新辉, 贾晓平, 等. 西江鱼类群落多样性及其演变. 中国水产科学, 2010, 17(2): 298–311]
- Li J, Li XH, Jia XP, *et al.* Relationship between fish community diversity and environmental factors in the Lianjiang River, Guangdong, China. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(18): 5795–5805 [李捷, 李新辉, 贾晓平, 等. 连江鱼类群落多样性及其与环境因子的关系. 生态学报, 2012, 32(18): 5795–5805]
- Li SZ, Dai DY, Zhang SY, *et al.* Notes on a collection of fishes from north Sinkiang, China. *Acta Zoologica Sinica*, 1966, 18(1): 41–56 [李思忠, 戴定远, 张世义, 等. 新疆北部鱼类的调查研究. 动物学报, 1966, 18(1): 41–56]
- Liu H, Niu JG, Liu CC, *et al.* Fish community structure and relationship with environmental factors of mainstream, Emin River, Xinjiang. *Chinese Journal of Ecology*, 2017, 36(12): 3558–3563 [刘鸿, 牛建功, 刘春池, 等. 新疆额敏河干流鱼类群落结构及其与环境因子的关系. 生态学杂志, 2017, 36(12): 1–6]
- Mao ZG, Gu XH, Zeng QF, *et al.* Community structure and diversity of fish in Lake Tai. *Chinese Journal of Ecology*, 2011, 30(12): 2836–2842 [毛志刚, 谷孝鸿, 曾庆飞, 等. 太湖鱼类群落结构及多样性. 生态学杂志, 2011, 30(12): 2836–2842]
- Shan XJ, Jin XS, Zhou Z, *et al.* Fish community diversity in the middle continental shelf of the East China Sea. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2011, 29(6): 1199–1208
- Su HC, Ba Y, Pang CH, *et al.* Change in Ebinur Lake area and its impact on eco-environment. *Journal of Glaciology and Geocryology*, 2006, 28(6): 941–949 [苏宏超, 巴音查汗, 庞春花, 等. 艾比湖面积变化及对生态环境影响. 冰川冻土, 2006, 28(6): 941–949]
- Sun PF, Dai FQ, Chen YL, *et al.* Seasonal variations in structure of fishery resource in the Yangtze River estuary and its adjacent waters. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(6): 8–16 [孙鹏飞, 戴芳群, 陈云龙, 等. 长江口及其邻近海域渔业资源结构的季节变化. 渔业科学进展, 2015, 36(6): 8–16]
- Wilhm JL. Use of biomass units in Shannon's formula. *Ecology*, 1968, 49(1): 153–156
- Wu YF, Wu CZ. The fishes of the Qinghai-Xizang Plateau. Chengdu: Sichuan Science and Technology Press, 1992 [武云飞, 吴翠珍. 青藏高原鱼类(第 版). 成都: 四川科学技术出版社, 1992]
- Yang YF, Wang Q, Chen JF, *et al.* Research advance in estuarine zooplankton ecology. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(2): 576–585 [杨宇峰, 王庆, 陈菊芳, 等. 河口浮游动物生态学进展. 生态学报, 2006, 26(2): 576–585]
- Yang YY, Li ZY, Wu Q, *et al.* Interannual variations in community structure and species diversity of fishery resources in the Laizhou Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(1): 22–29 [杨尧尧, 李忠义, 吴强, 等. 莱州湾渔业资源群落结构和多样性的年际变化. 渔业科学进展, 2016, 37(1): 22–29]
- Ye FL. Fish ecology. Guangzhou: Guangdong Higher Education Press, 2002 [叶富良. 鱼类生态学. 广州: 广东高等教育出版社, 2002]
- Young LJ, Young JH. *Statistical Ecology*: Springer US, 1998
- Zhang JT. *Numerical Ecology*. Second Edition. Beijing: Science Press, 2011, 372 [张金屯. 数量生态学(第 II 版). 北京: 科学出版社, 2011, 372]
- Zhang ZY, Jilili A, Jiang FQ, *et al.* Pollution and potential ecology risk evaluation of heavy metals in river water, top sediments on bed and soils along banks of Bortala River, Northwest China. *Environmental Science*, 2015, 36(7): 2422–2429 [张兆永, 吉力力·阿不都外力, 姜逢清. 博尔塔拉河河水、表层底泥及河岸土壤重金属的污染和潜在危害评价. 环境科学, 2015, 36(7): 2422–2429]
- Zhou H, Zhang ZN. Rationale of the multivariate statistical software PRIMER and its application in benthic community ecology. *Journal of Ocean University of Qingdao (Natural*

Science), 2003, 33(1): 58–64 [周红, 张志南. 大型多元统计软件 PRIMER 的方法原理及其在底栖群落生态学中的应用. 青岛海洋大学学报(自然科学版), 2003, 33(1): 58–64]

Zhu YS, Zhang LP. The study of hydrology and water resource

of Bortala River basin. Modern Agricultural Science and Technology, 2010(7): 295–296 [朱永生, 张莉萍. 博尔塔拉河流域水文水资源分析. 现代农业科技, 2010(7): 295–296]

(编辑 冯小花)

Spatial Distribution of the Fish Community and Its Relationship with Environmental Factors in the Bortala River in Winter

LIU Hong¹, NIU Jiangong¹, LIU Chunchi¹, XIE Peng², LIANG Jiefeng²,
CAI Lingang¹, MA Xufa², ZHANG Renming¹^①

(1. Xinjiang Fishery Research Institute, Scientific Observing and Experimental Station of Fishery Resources and Environment in Northwest China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Urumqi 830000;

2. Huazhong Agricultural University, Wuhan 430000)

Abstract Knowledge about the differences or variations in the fish community is important to assess and predict the effects of habitat loss or environment degradation on the river ecosystems. The Bortala River is an important interior river in Xinjiang, China. Although research regarding spring and summer fish communities has been reported, that regarding winter fish communities is lacking. Based on fishery resource surveys in November 2016 at the mainstream of the Bortala River, the fish community structure and diversity of the river were analyzed. The results indicated that a total of 1515 fishes were collected at 4 representative sections, which belonged to 3 orders, 4 families, 14 genera, and 15 species. The dominant species (IRI>1000) in the mainstream of the Bortala River were *Pseudorasbora parva*, *Abbottina rivularis*, and *Triplophysa strauchii*. A group-averaged hierarchical cluster based on the Bray-Curtis similarity index identified two spatial patterns of the fish assemblage at the 60% similarity level and four patterns of species composition at the 50% similarity level. The canonical correspondence analysis (CCA) suggested that altitude, temperature, and dissolved oxygen were the major environmental factors affecting the spatial patterns of fish assemblages in winter. The results of this study indicated that the species of native fish have declined, and the species of fish with low economic value have increased significantly. The aquatic ecosystem will be destroyed unless effective measures are taken to protect the native fish. Further studies are needed to investigate the mechanisms by which these factors operate together upon the fish assembles in the Bortala River in winter.

Key words Fish; Community structure; Environmental factor; Bortala River

① Corresponding author: ZHANG Renming, E-mail: xj01zrm@163.com

续附录1 博尔塔拉河各断面鱼类分布及体长体重范围

Appendix 1 The fish species, length range and weight range in each section of Bortala River, Xinjiang

物种 Species	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
	体长范围 Length range (mm)				体重范围 Weight range (g)			
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>				25~28				0.19~0.21
棒花鱼 <i>Abbottina rivularis</i>	21~60	32~71	21~81	23~58	0.05~4.12	0.50~6.51	0.12~7.93	0.23~2.88
鲮 <i>Hemiculter leucisculus</i>				102				10.05
短尾鲮 <i>Phoxinus brachyurus</i>	22~69				0.09~6.70			
鲫 <i>Carassius auratus</i>			14~127	36~89			0.06~61.95	1.21~15.26
新疆裸重唇鱼 <i>Gymnodiptychus dybowskii</i>	105	66			19.89	4.79		
麦穗鱼 <i>Pseudorasbora parva</i>	21~61	18~54	20~85	25~61	0.12~3.96	0.08~2.79	0.11~4.71	0.25~3.38
中华鲮 <i>Rhodeus sinensis</i>				42~43				1.57~1.71
准噶尔雅罗鱼 <i>Leuciscus merzbacheri</i>				67~80				4.14~7.10
无须鱏 <i>Acheilognathus gracilis</i>		39~46		50		1.22~1.93		2.55
斯氏高原鳅 <i>Triplophysa stoliczkae</i>			32~41				0.4~0.76	
新疆高原鳅 <i>Triplophysa strauchii</i>	24~78	25~114			0.14~5.03	0.11~18.41		
北方泥鳅 <i>Cobitis granoci</i>		95	32~49			4.76	0.25~1.09	
黄魮 <i>Hypseleotris swinhonis</i>	37	23~40	28~35	47	0.76	0.16~1.20	0.37~0.66	1.65
波氏栉虾虎鱼 <i>Ctenogobius cliffordpopei</i>	24~27		18~40	22~38	0.17~0.20		0.07~1.1	0.14~0.39

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180316001

http://www.ykxjz.cn/

王晓芹, Samuel P.S. Rastrick, 吴亚林, 房景辉, 杜美荣, 高亚平, 蔺凡, 姜妮妮, 李凤雪, 王军威, 张义涛, 方建光, 蒋增杰.
海水酸化胁迫对紫贻贝能量分配的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(3): 21–30
Wang XQ, Rastrick SPS, Wu YL, Fang JH, Du MR, Gao YP, Lin F, Jiang WW, Li FX, Wang JW, Zhang YT, Fang JG, Jiang ZJ.
Impact of seawater acidification on the energy budget of *Mytilus galloprovincialis*. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(3): 21–30

海水酸化胁迫对紫贻贝能量分配的影响*



王晓芹^{1,2} Samuel P.S. Rastrick⁵ 吴亚林^{1,2} 房景辉^{2,3}
杜美荣^{2,3} 高亚平^{2,3} 蔺凡^{2,3} 姜妮妮² 李凤雪^{1,2}
王军威⁴ 张义涛⁴ 方建光^{2,3} 蒋增杰^{2,3}①

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室
海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 4. 荣成楮岛水产有限公司
荣成 264312; 5. 挪威海洋研究所 卑尔根 5817)

摘要 2016 年 5~6 月在山东桑沟湾楮岛海区, 采用野外围隔和现场流水相结合的方法, 以紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)为研究对象, 以 pH 为 8.0 作为对照组, 探讨了酸化胁迫(pH=7.7)对其能量分配的影响。结果显示, 短期(10 d)海水酸化胁迫下, 紫贻贝的滤水率、同化效率、氧氮比显著下降($P<0.05$), 排氮率极显著增加($P<0.01$), 耗氧率无显著差异($P>0.05$); 中期(30 d)海水酸化胁迫下, 紫贻贝的滤水率和氧氮比显著下降($P<0.05$), 而同化效率、耗氧率、排氮率显著升高($P<0.05$)。能量收支的结果显示, 短期(10 d)酸化胁迫下, 紫贻贝的摄食能和吸收能显著降低($P<0.05$), 呼吸能无显著差异($P>0.05$), 排泄能显著增加($P<0.05$), 生长余力极显著降低($P<0.01$); 中期(30 d)海水酸化胁迫下, 摄食能降低($P<0.05$), 吸收能、呼吸能、排泄能、生长余力显著升高($P<0.05$)。氧氮比的结果显示, 在海水酸化胁迫下, 氧氮比的波动范围为 14.28~20.46, 贝类体内的供能物质由脂肪和碳水化合物逐渐向蛋白质过渡。研究结果为揭示紫贻贝应对海水酸化胁迫的生理响应提供了基础数据。

关键词 海洋酸化; 紫贻贝; 摄食; 代谢; 桑沟湾

中图分类号 S967 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)03-0021-10

自工业革命以来, 人类活动排放至大气中 CO_2 含量快速升高, 从而使海洋中 CO_2 溶解吸收量迅速增加, 最终引发了严重的海洋环境问题——海水酸化。在政府间气候变化专门委员会(IPCC)报道中发现, 海

洋表面的 pH 与工业革命前相比, 在 2000 年已经下降 0.1 个单位; 据预测, 到 2100 年将下降 0.3~0.5 个单位; 到 2300 年将会下降 0.8~1.4 个单位(Caldeira et al, 2005)。海洋表面 pH 的下降会引起海水中 H^+ 含

* 青岛海洋科学与技术国家实验室主任基金(QNLM201707)、中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金国际合作项目(20603022017019)和国家贝类产业技术体系养殖容量评估与管理岗位(CARS-49)共同资助 [This work was supported by Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (QNLM201707), the International Cooperation Project of the Special Scientific Funds for Central Non-Profit Research Institutes (20603022017019), and Modern Agro-Industry Technology Research System (CARS-49)]. 王晓芹, E-mail: 13589349936@163.com

① 通讯作者: 蒋增杰, 研究员, E-mail: jiangzj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-03-16, 收修改稿日期: 2018-04-28

量增多, CO_3^{2-} 减少, 尤其碳酸盐饱和度的下降, 从而对生态系统造成影响(Ferrari *et al.*, 2011)。近年来, 海水酸化是国际研究的热门领域之一, 在权威期刊已经有多篇关于海水酸化对海洋生物, 尤其是钙化生物影响的报道(Fabry *et al.*, 2008; Feely *et al.*, 2004; Doney *et al.*, 2009)。作为海洋中主要的钙化生物, 海水酸化对贝类的研究引起了科研工作者的关注, 主要涉及贝类的早期发育、钙化机制、生理能量、免疫调节方面(Talmage *et al.*, 2010; Green *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2015; Michaelidis *et al.*, 2005)。Talmage 等(2010)研究表明, 海水酸化(CO_2 浓度为 650×10^{-6})会导致硬壳蛤(*Mercenaria mercenaria*)、海湾扇贝(*Argopecten irradians*)、美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)幼虫的变态、生长和存活都受到一定程度的负面影响。Timmins-Schiffman 等(2013)发现, 海水酸化会使太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)受精后的幼体发育延缓。

紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)又称“淡菜”, 是我国黄海、渤海重要的海水经济贝类。据中国渔业统计年鉴(2016)报道, 贻贝海水养殖面积达 4.5万 hm^2 , 产量为 87.8 万 t, 占贝类海水养殖总产量的 6.2%, 在贝类海水养殖总产量中位居第 4 位。海水酸化的变化将会对贻贝的矿化、生长和生理过程造成不同程度的影响。Gazeau 等(2007)研究发现, 海水酸化(CO_2 浓度约为 740×10^{-6})会导致紫贻贝的钙化率下降至 25%。钙化过程的改变可能会进一步影响贝类的其他生理过程, 如能量转化、代谢和繁殖(王有基等, 2014)的过程。据 Navarro 等(2013)研究发现, 海水酸化(CO_2 浓度约为 1200×10^{-6})会导致智利蓝贻贝(*Mytilus chilensis*)摄食率和吸收效率显著降低, 从而引起贝类的吸收能量转化为生长能量大大降低。因此, 探究海水酸化对贻贝能量分配的影响对于研究贝类酸化的耐受能力是至关重要的。目前, 多数研究的酸化系统都是在实验室内进行模拟, 为了更好地获得海水酸化对紫贻贝生理活动影响的相关信息, 本研究采用野外围隔和现场流水相结合的实验方法, 研究了海水酸化对紫贻贝摄食吸收和代谢的影响, 探讨了酸化胁迫对紫贻贝能量分配的情况, 研究结果对于深入认识紫贻贝应对海水酸化胁迫的生理代谢机制提供了基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验地点的选择

实验地点位于山东省荣成市桑沟湾楮岛海域半

封闭的船舶避风港湾($37^\circ 02' 38.3'' \text{N}$, $122^\circ 33' 30.3'' \text{E}$), 该港湾为长方形, 长为 150 m, 宽为 100 m, 水深约为 5 m, 潮差 $\leq 2.0 \text{ m}$ 。通过湾北面约 10 m 的口门与外海相通, 外海的潮汐过程驱动湾内外的海水交换。

1.2 实验材料

实验所用紫贻贝于 2016 年 5 月 10 日采自山东省荣成市桑沟湾近海养殖区, 采集时选取长势健康且形态一致的紫贻贝, 采集后使用自然海水清洗贝壳表面附着物, 暂养于双层实验池内($0.8 \text{ m} \times 0.5 \text{ m} \times 0.5 \text{ m}$), 置于楮岛码头海区内长方形金属框的网箱内($2.0 \text{ m} \times 2.0 \text{ m} \times 1.0 \text{ m}$), 暂养 72 h 后用于后续酸化实验。

1.3 模拟酸化实验系统的搭建与生物驯化

设置 2 个海水 pH 处理组。pH 为 8.0 组(桑沟湾楮岛海区自然海水 pH)和 pH 为 7.7 组(根据 IPCC 预测的 22 世纪末期海洋 pH)。pH 为 8.0 组, 在网箱内通过充入干净的空气进行控制; pH 为 7.7 组, 通过控制 CO_2 和空气的流量获得 CO_2 与空气的饱和气体, 以便得到目标 pH 的酸化海水。酸化实验的搭建见图 1 (专利号 201611109362.X)。

暂养结束后, 挑选健康、形态一致的紫贻贝进行标号后称量, 分配到各个双层实验池中。pH 为 8.0 组和 pH 为 7.7 组各分配 45 枚贻贝[壳长为 $(54.22 \pm 4.68) \text{ mm}$]。每个处理组 3 个重复, 每个重复 15 枚贻贝。选取 9 枚贻贝在实验开始的第 10 天和第 30 天测定其滤水率、同化效率、耗氧率和排氨率、壳高、壳长、壳宽和湿重。

实验在 2016 年 5~6 月进行, 持续时间为 30 d。实验期间, 每天 08:00、12:00 和 18:00 测量海水的温度(T)、盐度(S)、溶解氧(DO)、pH 和总碱度(TA), 观察紫贻贝的生长情况。实验过程中没有紫贻贝死亡。海水的温度、盐度、DO 和 pH 等水质参数采用便携式水质分析仪(YSI 公司, Professional Plus, 美国)进行测定, TA 采用自动电位滴定仪(848MPT, 瑞士)测定。海水中无机碳体系各组分, 利用的海水 CO_2 系统计算公式软件($\text{CO}_2_SYS_XLS_v2.1$), 通过海水中的温度、盐度、pH、TA 计算出海水无机碳体系中碳酸氢根离子浓度(HCO_3^-)、碳酸根离子浓度 CO_3^{2-} 、 CO_2 分压($p\text{CO}_2$)、方解石饱和度(Ω_{calc})和文石饱和度(Ω_{arag})等参数。

1.4 现场流水实验

1.4.1 实验设计与搭建 实验用的流水装置搭建在桑沟湾楮岛码头, 实验用水直接取自码头内的海

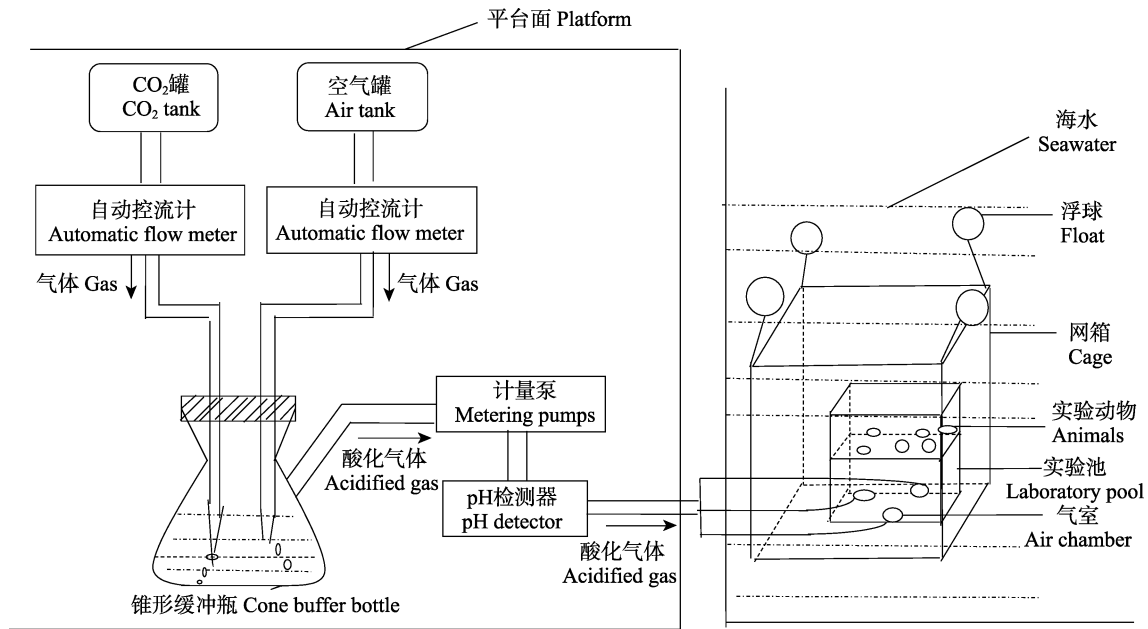


图1 酸化实验系统

Fig.1 The seawater acidification experimental system

水。实验流水集装箱(1.5 m×1.0 m×0.8 m)内设1个进水口, 利用水泵接于楮岛码头内的水箱(1.5 m×1.5 m×1.5 m); 1个流水口, 通过分流管接于码头上的流水槽(0.3 m×0.2 m×0.1 m); 1个溢水口, 集装箱内的水面始终保持在一个固定平面。实验开始时, 水箱内充入利用CO₂和空气预先配好的pH为7.7的酸化海水, 或是直接充入200目筛绢过滤好的自然海水, 利用水泵, 水流从水箱→集装箱→流水槽不断地流出。实验期间, 集装箱始终保持流水状态。采用YSI-556型溶氧仪测定水温、盐度、DO。

1.4.2 实验方法 滤水实验测定方法 将紫贻贝分别放入流水槽中适应1 h, 水流流速控制在200 ml/min范围内, 以3个不放贻贝的流水槽作为空白组。实验持续3 h, 每隔1 h从流水槽出水口接水样100 ml, 利用便携式颗粒计数器PAMAS (测定粒径范围2~200 μm, S4031GO, 德国)测定水样瓶中水体颗粒物数量。另外, 从空白组的流水槽接水样1000 ml, 利用预先灼烧并称重的GF/C玻璃纤维滤膜(孔径为1.2 μm, 450℃灼烧4 h, 重量保存至小数点后5位)收集水样中悬浮颗粒物浓度(TPM), 抽滤后的GF/C膜用锡纸包好, 并放入-20℃冰箱保存。

耗氧排氨实验测定方法 在集装箱中放置12个透明玻璃密封槽(∅0.15 m×0.1 m), 其中, 3个不放紫贻贝的密封槽作为空白组。槽内设有1个带有阀门的进水管、出水管, 密封槽进水管利用分流装置接入至进水泵。紫贻贝放入密封罐, 在流水的条件下适应1 h。耗氧实验开始时, 关闭槽内的进水泵, 静水环

境下驯化2 h, 依次用手持溶氧仪(Vernier ODO-BTA, 德国)测定密封槽内的溶解氧含量。实验结束后, 取100 ml海水用于氨氮(NH₄⁺-N)测定。

粪便的收集 将紫贻贝放入透明的聚乙烯水管(∅0.1 m×0.3 m)内, 两端固定20 μm的筛绢, 放置在实验海区的网箱内, 实验持续24 h。实验结束后, 利用预先灼烧的GF/C玻璃纤维滤膜收集贻贝的粪便, 用铝箔纸包好, 并放入-20℃冰箱保存。

实验过程中, 采集和保存的水样按照《海洋调查规范》(GB/T12763-2007)进行测定。实验结束后, 分离紫贻贝软组织, 在60℃烘干至恒重后, 称其重量并记录。回到实验室后, 将GF/C玻璃纤维滤膜收集的水样和粪便样品, 先用60℃烘干至恒重称其重量(W₆₀), 测其样品的总干重(TPM), 之后在450℃条件下, 用马弗炉煅烧4 h后称重(W₄₅₀), 计算样品的无灰分重量(POM), 预先灼烧的GF/C玻璃纤维滤膜重量(W₀)。样品的总干重(W_{TPM})和样品无灰分重量(W_{POM})的计算公式:

$$W_{POM}=W_{60}-W_{450}; W_{TPM}=W_{60}-W_0$$

1.4.3 各参数的测定方法

滤水率(Clearance rate, CR, L/h·g)=FR(L/h)×(C₁-C₀)/C₁/W

式中, FR为流水槽的流速, C₁、C₀分别为实验组和空白组实验水体中颗粒物数量。

同化效率(Absorption efficiency, AE, %)=(F-E)/[(1-E)F] (Conover, 1966)

式中, F 为颗粒物无灰分干重/食物总干重; E 为粪便无灰分干重/粪便总干重。

耗氧率(Respiration rate, RR, $\mu\text{mol}/\text{h}\cdot\text{g}$)= $[C_{i0}-C_t]\times V_r\times 60/(t_1-t_0)/W$

式中, t_1 、 t_0 分别为实验开始与结束时间; C_{i0} 、 C_t 为空白组和实验结束时贻贝组中溶解氧浓度; V_r 为密封槽的体积; W 为贝类的软组织干重。

排氨率(Ammonia excretion rate, AER, $\mu\text{mol}/\text{h}\cdot\text{g}$)= $[C_{i0}-C_t]\times(V/1000)\times 1/t/W$

式中, C_{i0} 、 C_t 分别为贻贝组与空白组氨氮浓度; V 为密封槽的体积; t 为驯化时间; W 为贝类的软组织干重。

组织干重标准化

$$Y_s=(W_s/W_e)^b\times Y_e$$

式中, Y_s 是生物软组织干重标准化后的生理参数; W_s 是标准重量(1 g); W_e 为测得的动物的组织干重; Y_e 是未标准化的生理参数; b 为 0.67(Wang *et al*, 2015)。

生长余力(SFG)

$$P=A-(R+U)$$

$$A=C\times AE$$

$$C=CR_{\max}(\text{L}/\text{h}\cdot\text{g})\times\text{POM}(\text{mg}/\text{L})\times 23(\text{J}/\text{mg})$$

(Slobodkin *et al*, 1961; Widdows *et al*, 1979)

式中, C 为摄食能(Ingested energy), 食物的能量转换系数为 23 J/mg; A 为吸收能(Absorbed energy); R 为耗氧能(Respired energy), 其能量转换系数为 0.456 J/ μmol ; U 为排泄能(Excreted energy), 其能量转化系数为 0.349 J/h。

氧氮比(O/N)为呼吸氧原子数与排出氨态氮原子数之比, 计算公式:

$$\text{O}/\text{N}=(\text{RR}/16)/(\text{ER}/14)$$

1.5 数据分析

采用 Excel 2007 和 SPSS 16.0 软件进行数据的整理和方差分析。实验结果采用平均数 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示, 采用 t 检验进行显著性差异分析, $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 实验水环境的变化

2.1.1 海水水环境参数的变化情况 2016 年 5~6 月野外围隔实验海区水环境参数的日均变化情况见表 1。从表 1 可以看出, 在实验过程中, 温度、盐度、DO 的变化比较稳定, 无显著差异($P>0.05$)。实验海区海水温度波动范围为 17~21 $^{\circ}\text{C}$; 盐度的波动范围为 31.5~32.5; DO 的变化范围为 5.7~6.2 mg/L; 自然海水 pH 的变化范围为 7.96 \pm 0.48, 实验组海水 pH 的变化范围为 7.68 \pm 0.43。

2.1.2 海水总碱度和无机碳体系各组分的时空变化

实验过程中, 实验海水的 TA、 HCO_3^- 、 CO_3^{2-} 、 $p\text{CO}_2$ 、 Ω_{calc} 和 Ω_{arag} 变化见表 2。从表 2 可以看出, 各无机碳参数在海水中的变化范围分别为 2047.48~2219.97 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 、1912.29~2108.96 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 、46.47~119.69 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 、604.4~1459.94 μatm 、1.13~2.93、0.73~1.88。海水中的 TA 和 HCO_3^- 浓度的变化相似, 无显著差异($P>0.05$)。在不同的酸化条件下, 海水中的 CO_3^{2-} 、 $p\text{CO}_2$ 、 Ω_{calc} 和 Ω_{arag} 浓度有显著差异($P<0.05$); 而 pH 为 8.0 组中的 CO_3^{2-} 、 Ω_{calc} 和 Ω_{arag} 显著高于酸化海水 pH 为 7.7 组, pH 为 8.0 组自然海水中的 $p\text{CO}_2$ 显著低于酸化海水 pH 为 7.7 组。

表 1 水环境参数的日均变化情况

Tab.1 The daily values of chemical factors of seawater

分组 Groups	pH	温度 Temperature($^{\circ}\text{C}$)	溶解氧 Dissolved oxygen (mg/L)	盐度 Salinity
pH8.0 组	7.96 \pm 0.48 ^a	19.09 \pm 1.95 ^a	6.03 \pm 0.13 ^a	32.07 \pm 0.48 ^a
pH7.7 组	7.68 \pm 0.43 ^b	18.95 \pm 1.99 ^a	5.89 \pm 0.14 ^a	32.08 \pm 0.43 ^a

注: 同一列不同字母为差异性显著($P<0.05$), 下同

Note: Values in the same line with different superscript indicate significant difference from each other ($P<0.05$), the same as below

表 2 海水无机碳体系各组分浓度

Tab.2 Concentration of carbonate system paramaters in the seawater

分组 Groups	总碱度 TA($\mu\text{mol}/\text{kg}$)	碳酸氢根离子浓度 HCO_3^- ($\mu\text{mol}/\text{kg}$)	碳酸根离子浓度 CO_3^{2-} ($\mu\text{mol}/\text{kg}$)	CO_2 分压 $p\text{CO}_2$ (μatm)	方解石饱和度 Ω_{calc}	文石饱和度 Ω_{arag}
pH8.0 组	2081.88 \pm 34.40 ^a	1950.93 \pm 38.64 ^a	106.79 \pm 12.90 ^a	625.40 \pm 21 ^a	2.61 \pm 0.32 ^a	1.68 \pm 0.20 ^a
pH7.7 组	2169.69 \pm 50.28 ^a	2060.67 \pm 48.29 ^a	58.77 \pm 12.30 ^b	1432.94 \pm 27 ^b	1.43 \pm 0.30 ^b	0.92 \pm 0.19 ^b

2.2 海水酸化胁迫对紫贻贝滤水率和同化效率的影响

海水酸化胁迫对桑沟湾海域紫贻贝滤水率和同化效率的影响见图 2。从图 2A 可以看出, 在酸化胁迫下, 第 10 天和第 30 天紫贻贝的滤水率分别为 (8.30 ± 0.31) 、 (6.40 ± 0.24) L/h·g, 相比于自然海水组, 分别下降了 31.05% 和 23.58%, 差异显著($F=10.20$, $P<0.05$; $F=9.50$, $P<0.05$)。

从图 2B 可以看出, 紫贻贝的同化效率受酸化胁迫和酸化时间的影响。在酸化第 10 天, 同化效率的平均值为 44.44%, 与自然海水组相比, 下降极显著($F=40.67$, $P<0.01$); 在酸化第 30 天, 同化效率的平均值为 61.20%, 与自然海水组相比, 显著增加($F=14.67$, $P<0.05$)。

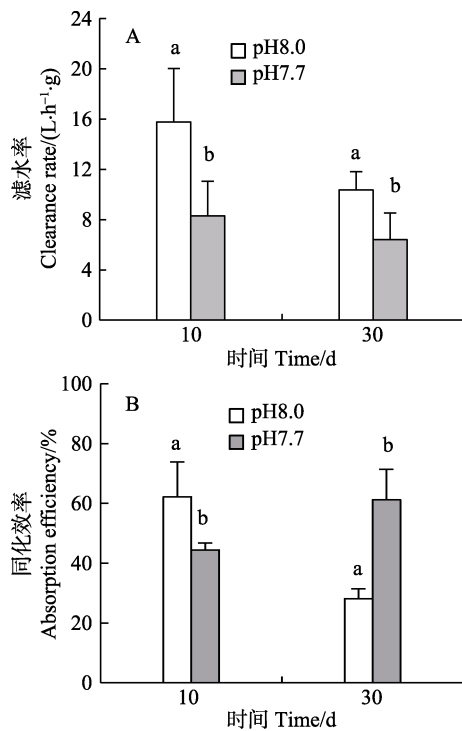


图 2 不同酸化和时间处理下紫贻贝滤水率(A)和同化效率(B)的变化

Fig.2 The clearance rate (A) and absorption efficiency (B) of *M. galloprovincialis* at the different pH and experiment time

图中相同时段内标有的不同字母的数据之间差异显著($P<0.05$), 下同

Data with different letters for the same time mean significant differences from each other ($P<0.05$), the same as below

2.3 海水酸化胁迫对紫贻贝代谢生理的影响

海水酸化胁迫对紫贻贝 RR 和 AER 影响见图 3。从图 3A、图 3B 可以看出, 紫贻贝受海水胁迫后, 其 RR 和 AER 变化规律非常相似, 均随着酸化时间呈上升趋势。显著性 t 检验分析结果显示, 在酸化第 10 天,

RR 增加, 但不显著($F=1.36$, $P>0.05$); AER 显著增加($F=27.68$, $P<0.05$); 在酸化第 30 天, RR 显著增加($F=12.86$, $P<0.05$), AER 增加极显著($F=33.29$, $P<0.01$)。

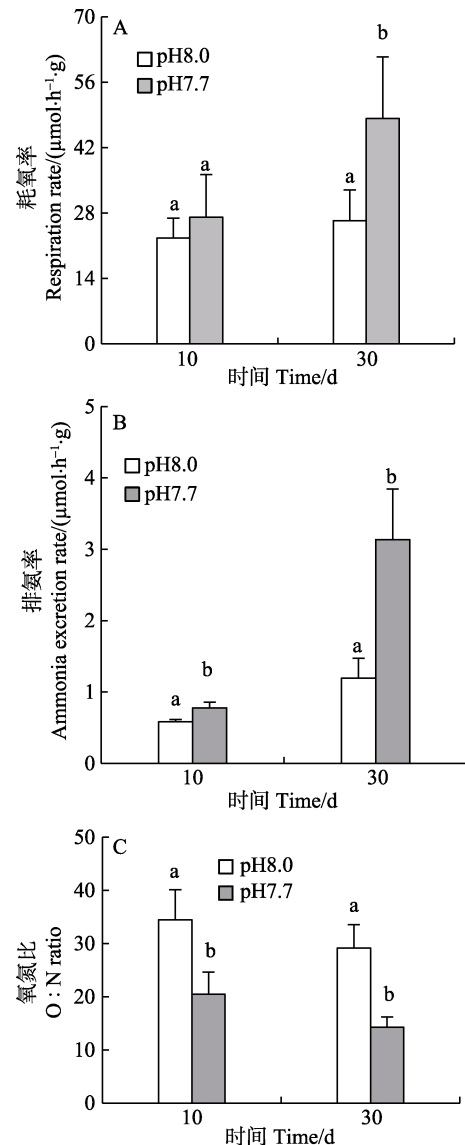


图 3 不同酸化和时间处理下紫贻贝耗氧率(A)、排氨率(B)和氧氮比(O/N)的变化

Fig.3 The respiration rate (A), ammonia excretion rate (B) and O/N ratio (C) of *M. galloprovincialis* at the different pH and experiment time

从图 3C 可以看出, 紫贻贝 O/N 随酸化胁迫时间的延长而减少。在酸化胁迫下, 第 10 天和第 30 天紫贻贝的 O/N 的平均值分别为 20.50 和 14.28, 与自然海水组相比, 显著下降($F=17.08$, $P<0.05$; $F=55.25$, $P<0.01$)。

2.4 海水酸化胁迫对紫贻贝能量收支的影响

在海水酸化胁迫下, 对紫贻贝能量收支的各项参数进行计算, 结果见表 3。从表 3 可以看出, 在短期

酸化胁迫 10 d 后,紫贻贝的摄食能和吸收能显著降低($F=14.02, P<0.05; F=21.22, P<0.05$),呼吸能无显著差异($F=2.23, P>0.05$),排泄能显著增加($F=5.62, P<0.05$),经计算单位软体部干重生长余力极显著降低($F=120.88, P<0.01$) (图 4)。在中期酸化胁迫(30 d)

后,紫贻贝的摄食能显著降低($F=12.09, P<0.05$),吸收能增加极显著($F=32.48, P<0.01$),呼吸能和排泄能显著升高($F=7.48, P<0.05; F=16.43, P<0.05$),呼吸能和排泄能共占总摄食能的 12.84%,生长余力极显著增加($F=179.94, P<0.01$) (图 4)。

表 3 海水酸化胁迫对紫贻贝能量收支的影响

Tab.3 Impact of seawater acidification on the energy budget of *M. galloprovincialis* (Mean±SD)

时间 Time (d)	分组 Group	滤水率 CR (L/h·g)	摄食能 Consumption energy (J/h·g)	同化效率 AE (%)	吸收能 A (J/h·g)	呼吸能 R (J/h·g)	排泄能 U (J/h·g)	生长余力 SFG (J/h·g)
10	pH8.0	15.79±4.26 ^a	186.85±68.03 ^a	62.20±11.65 ^a	116.20±42.31 ^a	10.95±2.51 ^a	0.23±0.04 ^a	105.23±18.79 ^a
	pH7.7	8.29±2.76 ^b	79.41±17.67 ^b	44.44±2.34 ^b	35.28±7.85 ^b	13.03±2.33 ^a	0.28±0.04 ^b	21.97±3.79 ^b
30	pH8.0	10.36±1.45 ^a	119.05±26.37 ^a	28.11±3.32 ^a	33.47±7.41 ^a	12.03±2.99 ^a	0.43±0.23 ^a	21.01±7.73 ^a
	pH7.7	6.41±2.11 ^b	145.28±37.07 ^b	61.20±10.18 ^b	88.91±22.69 ^b	17.65±3.48 ^b	1.01±0.30 ^b	70.26±7.36 ^b

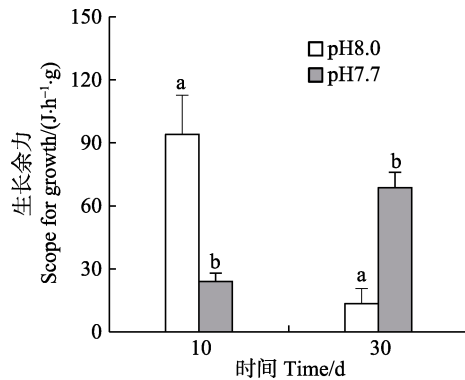


图 4 不同酸化条件不同处理时间下紫贻贝生长余力的变化

Fig.4 The SFG of *M. galloprovincialis* at the different pH and experiment time

3 讨论

3.1 海水酸化对紫贻贝摄食生理的影响

滤水率是研究贝类摄食生理的重要参数(Riisgård, 1991),它的大小直接受到生物所处环境的理化因子的影响(匡世焕等, 1996; 张继红等, 2005)。Fernández-Reiriz 等(2012)、Wang 等(2015)、Sui 等(2016)研究发现,海水酸化对滤食性贝类滤水率的影响因种类而异,厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)、紫贻贝的幼贝在海水酸化条件下,其滤水率未受影响。Liu 等(2012)对处于海水酸化下合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)的代谢生理进行研究,合浦珠母贝的滤水率在酸化条件下显著增加。但更多的研究表明,海水酸化胁迫会导致滤水率显著降低, Liu 等(2012)在同一酸化条件下对栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)和贻贝(*Mytilus*

edulis)滤水率的研究发现,2种海洋贝类的滤水率均显著降低。Fernández-Reiriz 等(2012)研究发现,槽蛤仔(*Ruditapes decussatus*)的滤水率受到酸化胁迫的显著抑制。这与本研究结果相似,在海水酸化 pH 为 7.7 的条件下,紫贻贝滤水率均显著降低(图 2A),并随酸化时间加长,紫贻贝第 10 天滤水率的平均值高于第 30 天。Navarro 等(2013)研究发现,酸化时间对智利蓝贻贝摄食活动也具有重要的影响,贻贝(CO₂ 浓度约为 750×10⁻⁶)在酸化海水中酸化 35 d 后,其摄食活性显著低于实验开始阶段(0 d)。从贝类的摄食行为中观察发现,在 pH≤7.0 的海水酸化下,太平洋牡蛎、食用牡蛎(*Ostrea edulis*)和紫贻贝这 3 种海洋贝类均表现为贝壳持续张开,行为活动极度不活泼,呈现一种极近“麻痹状态”,生长受到抑制,死亡率增加(Bamber *et al.*, 1990)。

贝类同化效率对海水酸化同样敏感。Wang 等(2015)在室内模拟 pH 为 7.7 的海水酸化研究显示,海水酸化对厚壳贻贝的同化效率几乎没有产生影响。但 Fernández-Reiriz 等(2011、2012)在 pH=Δ-0.4 的酸化条件下酸化 78 d 后发现,槽蛤仔幼体同化效率显著降低,但是,紫贻贝幼体同化效率却显著增加,说明酸化对海洋贝类的影响具有明显的种属特异性。而本研究发现,紫贻贝在同一酸化条件下,同化效率在第 10 天下降,在 30 d 时增加(图 2B)。出现这一现象的原因可能是因为短期酸化胁迫会显著影响贝类消化系统,但是,在长期的酸化环境下,紫贻贝逐渐适应这一环境,通过调节自身的营养吸收能力来抵消这种酸化的不利环境(Wang *et al.*, 2015)。Areekijserree 等(2004)研究发现,贝类体内某些消化吸收酶如淀粉酶、

肽酶、葡萄糖苷酶在 pH 较低时,其活性会显著增加,机体通过提高某些营养消化酶的活性,促进营养的吸收利用,使机体免受酸化损伤。这种现象对于紫贻贝这一物种应对酸化胁迫是非常有利的生存策略,但更深层次的生理机制方面的研究还有待进一步研究。

3.2 海水酸化对紫贻贝代谢生理的影响

RR 和 AER 是研究贝类代谢中最广泛的指标。研究发现,海水酸化会对 RR 和 AER 产生不同程度的影响(Thomsen *et al*, 2010; Fernández-Reiriz *et al*, 2012; Wang *et al*, 2015; Sui *et al*, 2016; Hu *et al*, 2017)。一方面,酸化时间会对贝类的代谢产生影响。厚壳贻贝在酸化处理 3 d,其 RR 和 AER 几乎没有产生影响,但利用相似的实验方法酸化 14 d 后发现,酸化会显著降低贻贝的 RR 和 AER (Wang *et al*, 2015; Sui *et al*, 2016)。另一方面,海洋酸化对贝类代谢的影响具有明显的种属特异性。Fernández-Reiriz 等(2011)在长期的酸化研究中发现,槽蛤仔的 RR 显著下降,AER 显著增加,而在紫贻贝中,虽然 AER 的变化一样,但对 RR 却几乎没有影响。本研究发现,在海水酸化胁迫条件下,紫贻贝的 RR 和 AER 都显著升高(图 3A、图 3B)。Lannig 等(2010)认为,酸化会影响贝类细胞内离子浓度(H^+ 、 CO_3^{2-} 、 HCO_3^- 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+})的变化,贝类通过提高代谢速率来维持细胞内酸碱离子的稳定。

O/N 是表示生物利用代谢底物的一个重要指标,反映有机生物在特定的环境状态下体内脂肪、糖类和蛋白质代谢的比例关系(Ruyet *et al*, 2004; 姜妮妮等, 2017)。另外, O/N 值的高低可以作为生物体适应环境压力的指标之一(Widdows *et al*, 1971)。当生物体以蛋白质代谢为主时, O/N 值约为 7.0~9.3; 当生物以脂肪和碳水化合物代谢为主时, O/N 值通常高于 24 (Mayzaud *et al*, 1973)。本研究中,紫贻贝受到酸化处理后的 O/N 值变化波动范围为 14.28~20.46,显著低于对照组($P<0.05$,图 3C),说明在海水酸化胁迫下,紫贻贝的供能物质由脂肪和碳水化合物逐渐向蛋白质过渡。

3.3 海水酸化对紫贻贝能量分配的影响

在环境压力下,生长余力是估算生物整体生理状态的一个重要能量指标。研究发现,通过海水酸化对贝类摄食能、吸收能、呼吸能和排泄能等生理过程的研究,可以反映出海水酸化对海洋贝类的生长余力的影响(Berge *et al*, 2006; Fernández-Reiriz *et al*, 2011; Sanders *et al*, 2013; Range *et al*, 2014)。在受到海水酸化胁迫后,贝类生长余力的降低,常常伴随着摄食能

和吸收能的减少、呼吸能和排泄能的增加、蛋白质的降解等过程,这已经在紫贻贝(Thomsen *et al*, 2010; Fernández-Reiriz *et al*, 2011)、厚壳贻贝(Wang *et al*, 2015)、槽蛤仔(Fernández-Reiriz *et al*, 2012)、长牡蛎(Lannig *et al*, 2010)中发现。在本研究中,在短期酸化胁迫 10 d,紫贻贝降低摄食、吸收能量,增加呼吸代谢能量消耗,最终导致贝类生长的能量减少,生长下降(表 3)。这与 Thomsen 等(2010)研究结果相一致,贝类往往会通过增加能量的需求和氮损失的协同作用来应对海水酸化胁迫的压力。Fernández-Reiriz 等(2011)研究发现,酸化胁迫导致槽蛤仔滤水、摄食降低,引起能量吸收的减少,氮代谢增加,生长变慢。本研究发现,紫贻贝在短期酸化 10 d,生长余力与对照组相比下降了 28.65%(图 4)。这与 Miller 等(2009)关于美洲牡蛎的研究结果一致。Navarro 等(2013)研究发现,智利蓝贻贝幼贝在 CO_2 中浓度约为 750×10^{-6} 、 CO_2 高浓度约为 1200×10^{-6} 的酸化海水中,生长率显著下降,分别下降 13%和 28%。在这一情况下,假设贻贝在正常海水(CO_2 浓度约为 380×10^{-6})中,其组织产量为 42120 kg/month,在中、高 CO_2 浓度的海水中处理后,其产量将分别减少 5500、12000 kg/month。这种现象说明在海水酸化中,贝类生长的降低,不仅会对贝类的健康产生危害,更严重的是这将会对贝类的养殖产业产生不可估量的损失。但值得注意的是,随着酸化胁迫延长至 30 d 后,紫贻贝的生长余力显著增加,与自然海水相比,增加了 30.70%,这种现象可能与长时间酸化胁迫后,紫贻贝同化效率和吸收能的增加有关,尽管贝类的呼吸能和排泄能显著增加,但代谢能仅占摄食能的 12.84%,所以,吸收能的显著增加是造成贝类生长余力显著增加的主要原因(表 3、图 4)。另外, Fernández-Reiriz 等(2012)通过相同的酸化条件,利用 CO_2 气体进行室内酸化模拟 78 d 后发现,紫贻贝稚贝同化效率的增加,吸收能增加,引起生长余力增加,这与本研究结果相一致。在长期酸化下,紫贻贝生长余力的增加,为以后抗逆品种的选育提供了很好的思路。需要指出的是,因实验场地、天气等原因,本研究仅持续了 30 d,对紫贻贝而言,在长期(半年以上)酸化条件下,是否能够通过稳定的高吸收效率来输送足够的生长能维持生长,尚需要长期尺度的海水酸化实验进行证实。

参 考 文 献

Areekijseree M, Engkagul A, Kovitvadhi U, *et al*. Temperature and pH characteristics of amylase and proteinase of adult

- freshwater pearl mussel, *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus* Simpson 1900. *Aquaculture*, 2004, 234(1): 575–587
- Bamber RN. The effects of acidic seawater on three species of lamellibranch mollusk. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1990, 143(3): 181–191
- Berge JA, Bjerkeng B, Pettersen O, *et al.* Effects of increased sea water concentrations of CO₂ on growth of the bivalve *Mytilus edulis* L.. *Chemosphere*, 2006, 62(4): 681–687
- Caldeira K, Wickett ME. Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. *Journal of Geophysical Research Oceans*, 2005, 110(9): doi:10.1029/2004JC002671
- Conover RJ. Assimilation of organic matter by zooplankton. *Limnology and Oceanography*, 1966, 11(3): 338–345
- Department of Agriculture, Fisheries Bureau. China fishery statistics yearbook. Beijing: China Agricultural Press, 2017 [农业部渔业局. 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2017]
- Doney SC, Lima I, Moore JK, *et al.* Skill metrics for confronting global upper ocean ecosystem-biogeochemistry models against field and remote sensing data. *Journal of Marine Systems*, 2009, 76(1–2): 95–112
- Fabry VJ. Ocean science. Marine calcifiers in a high-CO₂ ocean. *Science*, 2008, 320(5879): 1020–1022
- Feely RA, Sabine CL, Lee K, *et al.* Impact of anthropogenic CO₂ on the CaCO₃ system in the oceans. *Science*, 2004, 305(5682): 362–366
- Fernández-Reiriz MJ, Range P, Álvarez-Salgado XA, *et al.* Physiological energetics of juvenile clams *Ruditapes decussatus* in a high CO₂ coastal ocean. *Marine Ecology Progress*, 2011, 433: 97–105
- Fernández-Reiriz MJ, Range P, Álvarez-Salgado XA, *et al.* Tolerance of juvenile *Mytilus galloprovincialis* to experimental seawater acidification. *Marine Ecology Progress*, 2012, 454(2): 65–74
- Ferrari MC, McCormick MI, Munday PL, *et al.* Putting prey and predator into the CO₂ equation—qualitative and quantitative effects of ocean acidification on predator-prey interactions. *Ecology Letters*, 2011, 14(11): 1143–1148
- Gazeau F, Quiblier C, Jansen JM. *et al.* Impact of elevated CO₂ on shellfish calcification. *Geophysical Research Letters*, 2007, 34(7): L07603
- Green MA, Jones ME, Boudreau CL, *et al.* Dissolution mortality of juvenile bivalves in coastal marine deposits. *Limnology and Oceanography*, 2004, 49(3): 727–734
- Hu M, Lin D, Shang Y, *et al.* CO₂-induced pH reduction increases physiological toxicity of nano-TiO₂ in the mussel *Mytilus coruscus*. *Scientific Reports*, 2017, 7
- Jiang WW, Fang JG, Li JQ, *et al.* Effects of temperature change on physiological and biochemical activities of *Haliotis discus hannai* Ino. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(2): 220–230 [姜娓娓, 方建光, 李加琦, 等. 温度胁迫对皱纹盘鲍生理和生化活动的影响. *中国水产科学*, 2017, 24(2): 220–230]
- Liu WG, He MX. Effects of ocean acidification on the metabolic rates of three species of bivalve from southern coast of China. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2012, 30(2): 206–211
- Kuang SH, Fang JG, Sun HL, *et al.* Seasonal variation of filtration rate and assimilation efficiency of scallop *Chlamys farreri* in Sanggou Bay. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1996, 27(2): 194–199 [匡世焕, 方建光. 桑沟湾栉孔扇贝不同季节滤水率和同化率的比较. *海洋与湖沼*, 1996, 27(2): 194–199]
- Lannig G, Eilers S, Pörtner HO, *et al.* Impact of ocean acidification on energy metabolism of oyster, *Crassostrea gigas*—changes in metabolic pathways and thermal response. *Marine Drugs*, 2010, 8(8): 2318–2339
- Mayzaud P. Respiration and nitrogen excretion of zooplankton. II. Studies of the metabolic characteristics of starved animals. *Marine Biology*, 1973, 21(1): 19–28
- Michaelidis B, Ouzounis C, Palaras A, *et al.* Effects of long-term moderate hypercapnia on acid–base balance and growth rate in marine mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Ecology Progress*, 2005, 293(1): 109–118
- Miller AW, Reynolds AC, Sobrino C, *et al.* Shellfish face uncertain future in high CO₂ world: Influence of acidification on oyster larvae calcification and growth in estuaries. *PLoS One*, 2009, 4(5): e5661
- Navarro JM, Torres R, Acuña K, *et al.* Impact of medium-term exposure to elevated pCO₂ levels on the physiological energetics of the mussel *Mytilus chilensis*. *Chemosphere*, 2013, 90(3): 1242–1248
- Range P, Chicharo MA, Ben-Hamadou R, *et al.* Impacts of CO₂-induced seawater acidification on coastal Mediterranean bivalves and interactions with other climatic stressors. *Regional Environmental Change*, 2014, 14(1): 19–30
- Riisgård HU. Suspension feeding in the polychaete *Nereis diversicolor*. *Marine Ecology Progress*, 1991, 70(1): 29–37
- Ruyet PL, Mahé K, Bayon NL, *et al.* Effects of temperature on growth and metabolism in a Mediterranean population of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 2004, 237(1): 269–280
- Sanders MB, Bean TP, Hutchinson TH, *et al.* Juvenile king

- scallop, *Pecten maximus*, is potentially tolerant to low levels of ocean acidification when food is unrestricted. *PLoS One*, 2013, 8(9): e74118
- Slobodkin LB, Richman S. Calories/gm. in species of animals. *Nature*, 1961, 191(4785): 299–299
- Sui Y, Kong H, Huang X, *et al.* Combined effects of short-term exposure to elevated CO₂, and decreased O₂, on the physiology and energy budget of the thick shell mussel *Mytilus coruscus*. *Chemosphere*, 2016, 155: 207–216
- Talmage SC, Gobler CJ. Effects of past, present, and future ocean carbon dioxide concentrations on the growth and survival of larval shellfish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(40): 17246–17251
- Timmins-Schiffman E, O'Donnell MJ, Friedman CS, *et al.* Elevated pCO₂, causes developmental delay in early larval Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*, 2013, 160(8): 1973–1982
- Thomsen J, Melzner F. Moderate seawater acidification does not elicit long-term metabolic depression in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 2010, 157(12): 2667–2676
- Wang YJ, Li LS, Li QZ, *et al.* Research progress on eco-physiological responses of shellfish under ocean acidification and global warming. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(13): 3499–3508 [王有基, 李丽莎, 李琼珍, 等. 海洋酸化和全球变暖对贝类生理生态的影响研究进展. *生态学报*, 2014, 34(13): 3499–3508]
- Wang YJ, Li LS, Hu MH, *et al.* Physiological energetics of the thick shell mussel *Mytilus coruscus*, exposed to seawater acidification and thermal stress. *Science of the Total Environment*, 2015, 514: 261–272
- Widdows J, Bayne BL. Temperature acclimation of *Mytilus edulis* with reference to its energy budget. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1971, 51(04): 827
- Widdows J, Bayne BL, Livingstone DR, *et al.* Physiological and biochemical responses of bivalve molluscs to exposure to air. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1979, 62(2): 301–308
- Zhang JH, Fang JG, Sun S, *et al.* Clearance rate, ingestion rate and absorption efficiency of cultivated clam *Ruditapes philippinarum* in Jiaozhou Bay, China. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2005, 36(6): 548–555 [张继红, 方建光, 孙松, 等. 胶州湾养殖菲律宾蛤仔的清滤率、摄食率、吸收效率的研究. *海洋与湖沼*, 2005, 36(6): 548–555]

(编辑 陈严)

Impact of Seawater Acidification on the Energy Budget of *Mytilus galloprovincialis*

WANG Xiaoqin^{1,2}, Samuel P.S. Rastrick⁵, WU Yalin^{1,2}, FANG Jinghui^{2,3}, DU Meirong^{2,3},
GAO Yaping^{2,3}, LIN Fan^{2,3}, JIANG Weiwei², LI Fengxue^{1,2}, WANG Junwei⁴,
ZHANG Yitao⁴, FANG Jianguang^{2,3}, JIANG Zengjie^{2,3}^①

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 4. Rongcheng Chudao Aquaculture Corporation, Rongcheng 264312; 5. Institute of Marine Research in Norway, Bergen 5817)

Abstract The effect of seawater acidification on the energy budget of the mussel *Mytilus galloprovincialis* was studied using a combined *in situ* mesocosm and flow-through chambers approach in Sanggou Bay from May to June, 2016. The experimental groups of mussels were acclimated to different experimental pH values obtained by elevating seawater CO₂ concentrations. Clearance rates, absorption efficiency, respiration rates, ammonia excretion rates, and O/N ratios of *M. galloprovincialis* were measured after 10 and 30 days of treatment. The results showed that the clearance rates, O/N ratios, and absorption efficiency of *M. galloprovincialis* were reduced significantly after 10 days of exposure to acidified seawater (pH 7.7) ($P < 0.05$), whereas the rates of ammonia excretion were increased significantly ($P < 0.01$). The respiration rates in acidified and ambient seawater did not show significant difference ($P > 0.05$). However, after 30 days of exposure to acidified seawater, significantly increased absorption efficiency, respiration rates, and ammonia excretion rates ($P < 0.05$), and significantly reduced clearance rates and O/N ratios were observed ($P < 0.05$). Energy budget analysis showed that a 10-day exposure to acidified seawater resulted in significantly reduced ingestion energy, absorbed energy, and scope for growth ($P < 0.05$), but a significant increase in excreted energy ($P < 0.05$), whereas a 30-day exposure to acidified seawater resulted in significant reduction in ingestion energy ($P < 0.05$), but a significant increment in absorbed energy, respiration energy, excreted energy, and scope for growth ($P < 0.05$). The average values of O/N ratios ranged from 14.28 to 20.46 in all the experiments, suggesting that the energy source changed gradually from fats and carbohydrates to proteins under low pH conditions. These data provide theoretical insights into the possible mechanisms underlying the impact of seawater acidification on the physiological responses of mussels.

Key words Seawater acidification; *Mytilus galloprovincialis*; Feeding; Metabolism; Sanggou Bay

① Corresponding author: JIANG Zengjie, E-mail: jiangzj@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180419001

http://www.yykxjz.cn/

蔡碧莹, 朱长波, 刘慧, 常丽荣, 肖露阳, 孙倩雯, 蔺凡. 桑沟湾养殖海带生长的模型预测. 渔业科学进展, 2019, 40(3): 31-41

Cai BY, Zhu CB, Liu H, Chang LR, Xiao LY, Sun QW, Lin F. Model simulated growth of the kelp *Saccharina japonica* in Sanggou Bay. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(3): 31-41

桑沟湾养殖海带生长的模型预测*



蔡碧莹^{1,2,3} 朱长波⁴ 刘慧^{2,3①} 常丽荣⁵
肖露阳⁵ 孙倩雯^{1,2,3} 蔺凡^{2,3}

- (1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071;
4. 中国水产科学研究院南海水产研究所 广州 510300; 5. 威海长青海洋科技股份有限公司 荣成 264316)

摘要 海带(*Saccharina japonica*)是一种常见的大型经济褐藻,是海洋生态系统重要的初级生产者,也是我国北方沿海主要的养殖藻类。本研究旨在建立海带个体生长数值模型,并以此预测中国北方近海大规模筏式养殖条件下海带的生长情况。本研究以桑沟湾养殖海带为例,利用可视化模型软件 STELLA 描述海带生长的关键过程及其与环境参数的关系,以净生长量(N_{growth})=总生长量(G_{growth})-呼吸作用(resp)-腐烂(E_{kelp})为基本框架,模拟和预测海带的生物量和叶片长度变化。海带的总生长用光照、温度、盐度、海带体内营养盐(包括 N 和 P)等强制函数定义,其中,光照参数来自桑沟湾气象记录,盐度、温度和营养盐为现场调查实测值。模型模拟桑沟湾养殖海带的长度与干重结果与实测值的拟合度 R^2 值分别为 0.936、0.963,说明该模型能够很好反映海带的真实生长情况。可靠的个体生长模型是评估海带养殖容量的基础,并可为水产养殖区的空间规划提供决策依据。

关键词 桑沟湾; 海带; 个体生长模型; 环境条件; STELLA

中图分类号 S968.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)03-0031-11

桑沟湾的海带(*Saccharina japonica*)养殖始于 1957 年,产量逐年增加,目前已逾 10 万 t (张为先, 1992)。海带养殖产量与海带的长度和重量有关,生长状况较好的海带,长度、宽度和厚度都较大,出成率比较高。近年来,桑沟湾筏式养殖的海带在养殖后期(一般是 4 月下旬以后),叶片有明显的腐烂现象,并随时间推移愈加严重,在一定程度上影响了海带养殖产量和效益。Li 等(2007)研究表明,海带叶片末梢枯烂的现象从 11 月放苗开始出现,并持续整个养殖

周期。Suzuki 等(2008)发现,当温度超过 17.5℃,海带叶片末梢的腐烂率就已超过其生长率。同时,温度、光照和营养盐的变化都可能引起海带叶片末梢枯烂。

在过去的几十年里,国内外开发了一些用于模拟海藻生长的模型,一方面用于预测海带和石莼(*Ulva rigida*)等藻类的生长(Zhang *et al.*, 2016; Solidoro *et al.*, 1997),另一方面也用于绿藻和蓝藻等灾害藻类暴发的预警(Martins *et al.*, 2002; 汪浩等, 2012)。为了更好地模拟环境因素对海带生长的影响,本研究在桑沟湾

* 科技部国际创新合作专项“基于生态系统的水产养殖空间规划研究”(2016YFE0112600)和欧盟地平线 2020 项目 AquaSpace (633476-H2020-SFS-2014-2015)共同资助 [This research is supported by the Key Programme for International Cooperation on Scientific and Technological Innovation, Ministry of Science and Technology (2016YFE0112600) and EU Horizon 2020 Programme AquaSpace (633476-H2020-SFS-2014-2015)]. 蔡碧莹, E-mail: woshicaibiyang@126.com

① 通讯作者: 刘慧, 研究员, E-mail: liuhui@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-04-19, 收修改稿日期: 2018-04-28

的3个不同区域设置了采样站位,进行海带采样与环境监测。通过分析海带生长的主要限制因素,将其参数化,以动态能量学(Dynamic Energy Budget, DEB)理论为指导(Marianne *et al*, 2009),建立了基于桑沟湾的海带个体生长模型。通过模型运算可以有效预测不同的环境条件下,海带的生长状况和产量变化,为今后海区养殖容量的估算及养殖管理提供理论和技术支持。

1 材料与方法

1.1 研究海域

桑沟湾(37°01'~37°09'N, 122°24'~122°35'E)位于山东半岛东部沿海,是我国北方主要的浅海养殖水域之一,为半封闭海湾,呈“C”状。湾口南北宽 11.5 km,东西宽 7.5 km,海岸线长 90 km,面积为 144 km²。温度范围 2℃~26℃,年平均水温为 13℃;湾内盐度变化不大,平均盐度为 31.76;日光照时数平均为 208.4 h,年平均降雨 800 mm(国家海洋局一所,1988)。

实验在桑沟湾高区(High Zone, HZ)、中区(Medium Zone, MZ)、低区(Low Zone, LZ)设置了3个采样站,高区: 37°8'33.47"N, 122°37'59.22"E; 中区: 37°8'37.44"N, 122°36'30.98"E; 低区: 37°09'52.88"N, 122°35'10.06"E。其中,高区水深 23.4 m,流速较大,为 0.3 m/s 左右;中区水深 20 m,流速较为适宜,为 0.25 m/s 左右;低区水深 16.7 m,流速较小,为 0.1 m/s 左右。所有采样站位均用 GPS 进行准确定位(图 1)。桑沟湾筏式养殖海带采用间隔平养,养殖期为 11 月中旬到次年 7 月中旬。

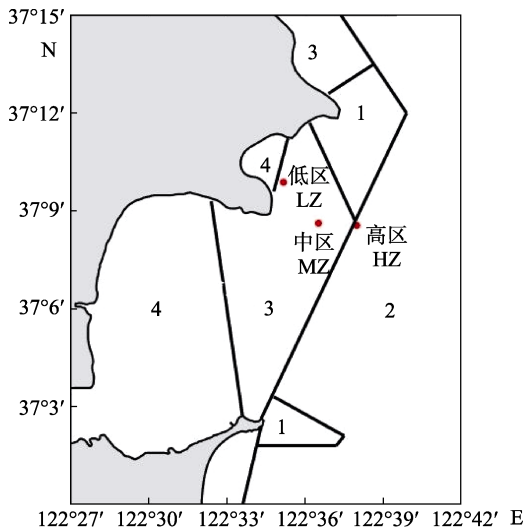


图1 桑沟湾海域采样点

Fig.1 The sampling points of Sanggou Bay

1.2 桑沟湾海域环境及海带生长参数

海带个体生长模型的概念流程如图 2 所示。实验对桑沟湾海带 2016 年 11 月至 2017 年 6 月的生长情况和环境条件进行监测。环境监测项目包括水体表面温度 T (℃)、水体盐度 S 、营养盐 N 和 P 浓度($\mu\text{mol/L}$)、环境光照 I ($\mu\text{mol/m}^2 \cdot \text{s}$)以及颗粒有机物浓度 $\text{TPM}(\text{mg/L})$,每 30 d 左右监测 1 次。环境参数按照《海洋调查规范》要求采样,海水中营养盐、 TPM 的分析均按照《海洋监测规范》(GB 17378-2007)进行。海带生长情况监测项目包括干重 $\text{DW}(\text{g})$ 和长度 $\text{Length}(\text{cm})$,每 30 d 左右监测 1 次,每次测量 5 个个体。

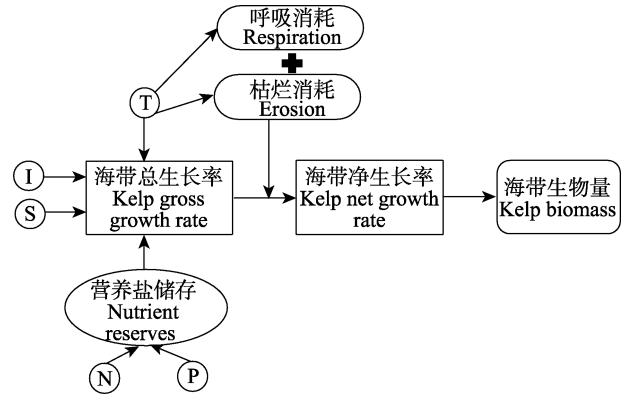


图2 海带生长模型概念流程

Fig.2 Conceptual diagram of the kelp growth model

注:强制函数包括 T (温度)、 I (光照)、 S (盐度)、 N (溶解性无机氮包括: NH_4^+-N 、 NO_3^--N)、 P (溶解性无机磷: $\text{PO}_4^{3-}-\text{P}$)
Note: The forcing functions include T (temperature), I (light), S (salinity), N (dissolved inorganic nitrogen including: NH_4^+-N and NO_3^--N), P (dissolved inorganic phosphorus: $\text{PO}_4^{3-}-\text{P}$)

1.3 模型函数

海带的净生长量(N_{growth})由其总生长量(G_{growth})与呼吸作用(resp)和海带腐烂(E_{kelp})之差决定:

$$N_{\text{growth}} = G_{\text{growth}} - \text{resp} - E_{\text{kelp}}$$

式中,呼吸作用(resp)主要采用 Jørgensen 等(2008)关于计算呼吸作用的公式:

$$\text{resp} = R_{\text{max}20^\circ\text{C}} \times \theta^{T-20}$$

式中, $R_{\text{max}20^\circ\text{C}}$ 为 20℃ 最大呼吸速率, θ 为经验系数经模型校正取 1.02。

G_{growth} 受海带最大生长率(μ_{max})、温度(T)的变动、光照的限制(I)、盐度限制(S)及营养物的限制(N 、 P)共同作用。利用相乘限制方法,即:

$$G_{\text{growth}} = m_{\text{max}} \times f(T) \times f(I) \times f(S) \times f(NP)$$

海带的生长遵循在最适温度附近的偏正态分布, 所以采用如下温度函数(Radach *et al*, 1993):

$$f(T) = \exp\left[-2.3 \times \left(\frac{T - T_{opt}}{T_x - T_{opt}}\right)^2\right]$$

式中, T_{opt} 和 T_x 分别代表海带生长的最适温度和温度生态幅; 当 $T \leq T_{opt}$ 时, $T_x = T_{min}$ (温度生态幅下限); 当 $T > T_{opt}$ 时, $T_x = T_{max}$ (温度生态幅上限)。

海带在高强度的光强下光合作用受到抑制, 生长处于抑制状态(张起信, 1994)。因此, 光照函数采用 Steele 公式光抑制模型最优曲线(Steele *et al*, 1962):

$$f(I) = \frac{I}{I_{opt}} \times e^{\left(1 - \frac{I}{I_{opt}}\right)}$$

式中, I_{opt} 为光合作用最适光强, I 为到达海带表面的光照强度。

潮位的变化会引起光照水深的变化。由于海带为筏式养殖生物, 浮筏本身会随着潮水升降, 所以潮位的变化并不会引起养殖生物水层的变化, 海带基本保持固定的生长水层不变。同时, 由于水流的存在, 海带基本上是漂浮在水的上层。在深度(Z)光照(I)的变化, 用 Beer 公式(Parsons *et al*, 1990)表示:

$$I = I_0 \times \exp(-k \times Z)$$

式中, I_0 为水表面的光强, k 为吸光系数, Z 为水层深度。

养殖海区水体的初级生产力也取决于水中的吸光系数 k 。潮位的变化所引起的涨潮、退潮以及风浪流, 都能对水体和海床造成扰动。这种变化引起的海底沉积物的再悬浮是引起 k 变化的主要因素。Suzuki 等(2008)在桑沟湾研究得出 TPM 与 k 之间的关系, 建立经验公式如下:

$$k = 0.0484 \times \text{TPM} + 0.0243$$

公式描述了 k 与 TPM 之间的关系, 利用不同时刻的 TPM 测值输入模型, 进一步反映 Z 深度下的光照变化情况。

光照强制函数的输入, 不能以某一天的某一时刻光照作为变量输入, 应参考养殖海区的当日平均光照情况, 同时需要考虑每月的晴日天、阴雨雪天、当月的日照时长等。根据中国气象局对荣成市 2016~2017 年的天气预测, 计算了每月晴日天及阴雨天数、每月的日照时长; 并且根据实测的桑沟湾海域晴日天及阴雨天气光照强度, 一天平均海表面光照强度分别为 550、385 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ 。

平均海表光照强度公式:

$$I_0 = \frac{\text{日照时长} \times (\text{晴日天} \times 550 + \text{阴雨天} \times 385)}{\text{总天数} \times 24}$$

针对桑沟湾盐度变化情况, 参照 Martins 等(2002)浒苔模型中对盐度限制的表达式:

$$f(S) = 1 - \left(\frac{S - S_{opt}}{S_x - S_{opt}}\right)^m$$

式中, S_{opt} 为最适生长盐度, 当 $S < S_{opt}$, $S_x = S_{min}$ (停止生长的盐度耐受的最小值), $m = 2.5$; $S \geq S_{opt}$, $S_x = S_{max}$ (停止生长的盐度耐受的最大值), $m = 2$ 。

海带生长受相对最缺乏的营养盐限制, 海带体内氮磷比(N/P)是 12~16 时, 营养盐最易被海带吸收。因此, $N/P < 12$, $f(NP) = f(N)$; $12 \leq N/P \leq 16$, $f(NP) = 1$; $N/P > 16$, $f(NP) = f(P)$ (Martins *et al*, 2002)。

海带对 N 营养盐的吸收特征符合饱和吸收动力学。同时, 因为藻类的生长取决于细胞内浓度, 而不是水体中的浓度, 根据 Michaelis-Menten ($N_{int} - N_{imin}$) 米氏方程计算:

$$f(N) = \frac{N_{int} - N_{imin}}{K_q + N_{int} - N_{imin}}$$

式中, N_{int} 和 N_{imin} 分别是海带体内游离 N 含量、海带体内游离 N 的最低需求, K_q 为 N 的半饱和同化系数。

海带对 $\text{PO}_4\text{-P}$ 的吸收动力学特征不符合米氏方程, 藻体的生长随体内 P 的增加呈线性增加(Jørgensen 等, 2008)。

$$\text{如 } P_{int} < P_{imax}, f(P) = \frac{P_{int}}{P_{imax}}; \text{ 如果 } P_{int} \geq P_{imax}, f(P) = 1$$

式中, P_{int} 和 P_{imax} 分别是海带体内游离 P、维持最大生长率所需的体内游离 P 含量。

海带体内游离 N、P 营养盐含量(N_{int} , P_{int})的计算是将吸收的营养盐(φ)减去同化为组织的营养盐(γ)得到。

$$\varphi = \frac{X_{imax} - X_{int}}{X_{imax} - X_{imin}} \times \frac{V_{max} \times X_{ext}}{K_x + X_{ext}}$$

$$\gamma = X_{int} \times G_{growth}$$

式中, X 代表 N 或 P; V_{max} 为 N 或 P 营养盐的最大吸收速率; K_x 为 N 或 P 营养盐吸收的半饱和常数; X_{ext} 为海水中无机 N 或 P 营养盐含量。

海带存在由于光照过强引起的白烂病, 光照过弱引起的绿烂病等病理性枯烂, 这类枯烂可根据光照情况及时调节养殖水层得到改善。除了海带病理性枯烂, 海带叶片末梢枯烂也是一种遗传特性, 当温度或其他环境条件改变, 海带末梢开始枯烂, 并通过枯烂组织的营养盐循环, 促进海带分生组织的生长, 有利于孢子的放散, 属于一种生存机制(Li *et al*, 2007)。在 4 月以前, 海带末梢枯烂并不明显, 之后随着海水温

度的不断升高,末梢枯烂率大幅度上升,5月枯烂率达到最大,以后保持平稳状态(Li *et al.*, 2007; Mizuta *et al.*, 2003)。综上所述,根据海带的最佳温度(T_{opt})与海水中的温度(T)之间的差值作为指数,得出海带枯烂的方程:

$$E_{kelp} = E_{max} \times P^{(T-T_{opt})}$$

式中, T_{opt} 为海带最适生长温度, T 为不同时刻的温度测量值, P 为经验系数经模型校正, 取 1.05, E_{max} 为海带最大枯烂率。

吴荣军等(2009)对于海带长度与干重得到的经典公式,可能是存在海带干湿比不同等因素,与作者的海带长度与干重实测值有一定差异。本研究通过 Origin 9.0 软件对吴荣军海带长度与干重经典公式进行系数校准,得出海带长度与干重经典公式为:

$$L = \exp\left[\ln(DW \times 10^{6.28}) / 3.35\right]$$

式中, L 为海带长度, DW 为海带干重。

1.4 状态变量及强制函数

模型中的 3 个状态变量包括海带体内营养盐含量(N_{int} , P_{int} , $\mu\text{mol/g}$)、海带的干重(DW , g)、 $N_{int}(t)$ 、 $P_{int}(t)$ 、 $DW(t)$:

$$\begin{aligned} N_{int}(t) &= N_{int}(t-dt) + \phi_N - \gamma_N \\ P_{int}(t) &= P_{int}(t-dt) + \phi_P - \gamma_P \\ DW(t) &= DW(t-dt) + N_{growth} \end{aligned}$$

模型中状态变量的初始值 N_{int} 和 P_{int} 的取值,采用海带组织氮 TN 含量及组织磷 TP 含量以海带干重的百分比(% DW)表示(王文雷等, 2009)。Zhang 等(2016)测定 1 月海带 TN 为 1.51%, 经过单位换算为 $N_{int}=1071 \mu\text{mol/g}$ 。刘嘉伟等(2017)测定海带 TP 为 0.218%, 经过单位换算为 $P_{int}=70.32 \mu\text{mol/g}$ 。

强制函数(Forcing functions)也称为外部变量,它是影响生态系统状态的外部变量或函数。模型可以用来预测强制函数随时间变化时,生态系统的状态将产生何种变化和影响。水温 $T(^{\circ}\text{C})$ 、光照 $I(\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s})$ 、水体 N 含量 $N_{ext}(\mu\text{mol/L})$ (包括 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$)、水体中的 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 含量 $P_{ext}(\mu\text{mol/L})$ 、水体中颗粒物浓度 $\text{TPM}(\text{mg/L})$ 为模型的强制函数,根据不同时刻的实测值输入。

1.5 模型中的参数

模型总共包含 22 个常变量(表 1),与营养盐吸收消耗相关参数为 11 个,海带生长消耗相关参数 3 个,海带生长环境相关参数 8 个。模型中大部分重要参数来自桑沟湾海区实验研究结果及相关文献。

海带孢子体适温范围很广,最适温为 5~10 $^{\circ}\text{C}$,结合养殖生产实际,适温范围约在 12~13 $^{\circ}\text{C}$ 左右(张为先等, 1992; 曾呈奎等, 1994),模型选择海带生长最佳温度 T_{opt} 为 12 $^{\circ}\text{C}$, T_{min} 为 0.5 $^{\circ}\text{C}$, T_{max} 为 20 $^{\circ}\text{C}$ 。

季仲强(2011)研究不同盐度下海带对 N、P 营养盐的吸收效率表明,盐度为 3 时, P 的吸收出现了负吸收现象。陈根禄(1958)提出,盐度为 29~32 最适宜海带生长。因此,设 S_{min} 为 3,盐度上限 S_{max} 为 40,最适盐度 S_{opt} 设为 30。张起信(1995)设定的 I_{opt} 范围为 252~396 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$, Duarte 等(2003)对于 I_{opt} 的设定值为 491.4 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$,模型设定 I_{opt} 为 350 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ 。

根据沈淑芬(2013)对海带 N、P 营养盐吸收动力学特征的研究,选取 $V_{max\text{NO}_3}$ 、 $V_{max\text{NH}_4}$ 、 $V_{max\text{PO}_4}$ 分别为 10.28、52.63、8.58 $\mu\text{mol}/\text{g}\cdot\text{h}$,经单位换算分别为 246.72、1263.12、205.92 $\mu\text{mol}/\text{g}\cdot\text{d}$,对应的 K_{NO_3} 、 K_{NH_4} 、 K_{PO_4} 分别为 29.02、169.49、6.01 $\mu\text{mol/L}$ 。N 含量为干重的 2.4%, 1.3% 分别为 N_{imax} 和 N_{imin} ,经单位换算及模型率定设为 1714 $\mu\text{molN}/\text{gDW}$ 和 300 $\mu\text{molN}/\text{gDW}$ (Mizuta *et al.*, 1992)。 P_{imax} 和 P_{imin} 选取 171 $\mu\text{molP}/\text{gDW}$ 和 30 $\mu\text{molP}/\text{gDW}$ (Mizuta *et al.*, 2003)。 K_q 和 $R_{max20^{\circ}\text{C}}$ 参数值取自 EPA(1985)并进行模型校正。

海带一般是漂浮在水中,1月开始加入浮球,提升海带的养殖水层,使海带分生组织基本保持在 50 cm 左右水层,因此,选择 Z 为 0.5 m。

姚海芹(2016)测量海带平均日生长速率范围在 (0.15~0.75)/d 之间,根据文献及模型调试选取 0.6/d 为海带的最大生长率。针对海带枯烂率研究表明,海带在整个养殖周期,枯烂的长度约为 196 cm, 2.0 cm/d 为海带最大枯烂率(Mizuta *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007),枯烂鲜重为(4.0 \pm 0.9) gwt/d (Suzuki *et al.*, 2008),结合此时海带的鲜重,换算成百分比约为 0.006/d,假定同一海带各部分的干湿比一致,选择 0.006 为 E_{max} ,海带生长模型中相应参数与取值见表 1。

1.6 模型构建及运行

在海带生长的生理生化过程分析的基础上,利用可视化模型软件 Stella Architect 1.4.3 构建上述的公式及参数,基于 Stella 软件构建出海带生长模型流程图(图 3)。其中,模型设置包括时间步长为 0.04 d,根据海带养成时间设置模拟时长为 220 d。以海带苗的放苗时间为准,低区 11 月 15 日,中区 11 月 24 日,高区 12 月 7 日,高、中、低区分别设定不同的模型运算开始时间。高、中、低区海带干重(DW)的初始值分别为 0.5 g、0.45 g、0.25 g。

表 1 海带生长模型中的参数与取值
Tab.1 Parameters of growth model of kelp (*Saccharina japonica*)

参数 Parameter	定义 Description	单位 Units	参数值 Value	参考文献 Reference
μ_{\max}	适宜温度下最大生长速率 Maximum growth rate at T_{opt}	d^{-1}	0.6	姚海芹等(2016)
I_{opt}	光合作用的最适光强 Optimum light intensity for photosynthesis	$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	350	张起信(1995) Duarte 等(2003)
T_{opt}	最适生长温度 Optimum temperature for growth	$^{\circ}\text{C}$	12	曾呈奎等(1962) 张为先等(1992)
T_{\max}	生长温度生态幅的上限 Upper temperature tolerance limit at which growth ceases	$^{\circ}\text{C}$	20	曾呈奎等(1962)
T_{\min}	生长温度生态幅的下限 Lower temperature tolerance limit at which growth ceases	$^{\circ}\text{C}$	0.5	曾呈奎等(1962)
S_{opt}	最适生长盐度 Optimum salinity for growth	无 None	30	陈根禄等(1958) 季仲强(2011)
S_{\max}	停止生长的盐度耐受的最大值 Upper salinity tolerance limit at which growth ceases	无 None	40	季仲强(2011)
S_{\min}	停止生长的盐度耐受的最小值 Lower salinity tolerance limit at which growth ceases	无 None	3	季仲强(2011)
$R_{\max 20^{\circ}\text{C}}$	20℃最大呼吸速率 Maximum respiration rate at 20℃	d^{-1}	0.015	EPA(1985)
N_{imin}	体内游离 N 最低需求 Minimum internal quota (subsistence quota) for nitrogen	$\mu\text{mol N}\cdot\text{gdw}^{-1}$	300	模型率定; EPA(1985)
N_{imax}	维持最大生长率所需的体内游离 N 含量 Internal quota of free nitrogen for maximum growth	$\mu\text{mol N}\cdot\text{gdw}^{-1}$	1714	Mizuta 等(1992)
k_q	无机 N 的半饱和和同化常数 Nitrogen half-saturation constant for growth	$\mu\text{mol N}\cdot\text{gdw}^{-1}$	250	EPA(1985)
$V_{\max\text{NO}_3}$	$\text{NO}_3\text{-N}$ 最大吸收速率 Maximum nitrate uptake rate	$\mu\text{mol NO}_3\cdot\text{gdw}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	246.72	沈淑芬(2013)
$V_{\max\text{NH}_4}$	$\text{NH}_4\text{-N}$ 最大吸收速率 Maximum ammonium uptake rate	$\mu\text{mol NH}_4\cdot\text{gdw}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	1263	沈淑芬(2013)
K_{NO_3}	$\text{NO}_3\text{-N}$ 半饱和吸收常数 Half-saturation constant for uptake of nitrate	$\mu\text{mol NO}_3\cdot\text{L}^{-1}$	29	沈淑芬(2013)
K_{NH_4}	$\text{NH}_4\text{-N}$ 半饱和吸收常数 Half-saturation constant for uptake of ammonium	$\mu\text{mol NH}_4\cdot\text{L}^{-1}$	169.49	沈淑芬(2013)
P_{imax}	维持最大生长率所需的体内游离 P 含量 Internal quota of free phosphorus for maximum growth	$\mu\text{mol PO}_4\cdot\text{gdw}^{-1}$	171	Mizuta 等(2003)
P_{imin}	体内游离 P 最低需求 Minimum internal quota(subsistence quota) for phosphorus	$\mu\text{mol PO}_4\cdot\text{gdw}^{-1}$	30	Mizuta 等(2003)
$V_{\max\text{PO}_4}$	$\text{PO}_4\text{-P}$ 最大吸收速率 Maximum phosphorus uptake rate	$\mu\text{mol PO}_4\cdot\text{gdw}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	205.92	沈淑芬(2013)
K_{PO_4}	$\text{PO}_4\text{-P}$ 的半饱和吸收常数 Half-saturation constant for uptake of phosphorus	$\mu\text{mol PO}_4\cdot\text{L}^{-1}$	6.01	沈淑芬(2013)
E_{\max}	海带最大腐烂率 Maximum erosion rate of kelp	d^{-1}	0.006	Li 等(2007)
Z	海带养殖深度 Depth for kelp culture	m	0.5	模型率定

2 结果与分析

2.1 环境实测值

图 4 为桑沟湾高、中、低区 2016 年 11 月到 2017 年 6 月的环境实测值, 包括温度、盐度、TPM、营养

盐(氨氮 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、硝酸盐 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、磷酸盐 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$)。在海带养殖期内, 低区的温度略高于中、高区。高区的营养盐较中、低区含量丰富, 另一方面高区在桑沟湾养殖区外侧, 流速较大, 水体中颗粒物浓度也较其他区域高。

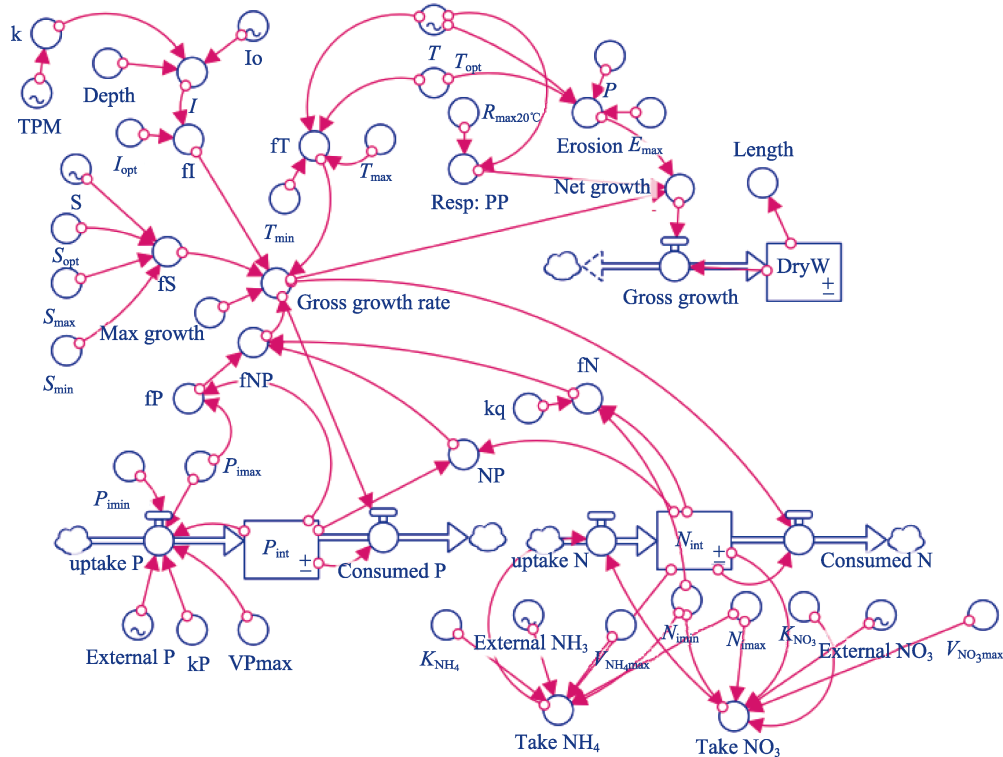


图 3 基于 Stella 软件构建的海带生长模型流程
Fig.3 Flow chart of kelp growth model based on Stella software

养殖区域温度是养殖生物必须考虑的关键环境因素。不同藻类均有其最适宜生长温度，温度高于或低于养殖生物最适宜生长温度，都有可能造成胁迫，引起细胞膜结构破坏，抑制养殖生物生长，从而造成个体损伤甚至死亡(Sies *et al*, 1993)。图 5 是模型温度强制函数的输出曲线。海带最适生长温度为 12℃，海带苗刚下海时海水温度为 15℃左右，超过了海带的最适宜生长温度，随着天气逐渐转冷，达到了海带适宜生长温度，3 月开始温度逐步升高，5 月中旬左右达到 12℃，随后温度开始持续攀升，对海带生长的限制作用加强，直到 6 月中旬左右食品海带收获结束。

养殖区域的营养盐对于海带的生长起着至关重要的作用，营养盐偏低在一定程度上限制了养殖容量，大面积的养殖生物及养殖筏架影响了养殖区域的水交换，使外部的营养盐难以进入湾内，成为限制水体生产力的关键因素。水体中 P 含量较少，海带生长内部所需的 P 也很少，氮磷比符合海带生长的条件，根据图 5 所示， $f(P)$ 的值稳定在 0.8~0.9， $f(N)$ 的值稳定在 0.54~0.75，图 7 所示 $f(NP)$ 的值稳定在 0.54~1。尽管水体中的 N、P 浓度很低，但是沉积物不断提供的 N、P 仍然可以满足海带生长的需要，削弱了水体中 N、P 含量低对海带的限制作用。

桑沟湾太阳辐射冬季辐射最低，春季不断攀升，夏季达到最大值，秋季随之下降。太阳辐射通过养殖

水体又经过光的反射、散射损失大部分光能，海带可利用的光能大幅度减少，可见光(400 nm~750 nm)的总能量衰减了 58%，只有 42%光照总能量可被海带所利用进行光合作用(Ferreira *et al*, 1989)。适宜的流速也使海带大部分时间均处于漂浮状态，以利于提高海带的受光面积，提高海带的产量。

桑沟湾盐度四季保持在 32 左右，接近海带生长最适盐度 30，对海带生长限制较小，盐度强制函数 $f(S)$ 保持在 0.91~0.96 常数。鉴于盐度在桑沟湾海带生长过程中起的限制作用较小，在模型构建上也可忽略盐度这一环境因素对海带生长的影响，而对于一年中盐度变化较大的海域，例如，南方降水量大，盐度变化明显，或是盐度对于养殖生物影响较大的物种进行模型构建时，盐度则是不可或缺的关键环境因素。

2.2 海带生长模拟值与实测值

高、中、低区海带长度和干重的实测值与模拟值情况如图 8、图 10 所示。从模拟生长曲线与海带实测值的比较情况来看，模型可以较好地模拟出海带在不同环境下的长度生长。高、中、低区海带的长度和干重模拟值大部分在实测值的标准误差范围内，能够较好地模拟不同区域海带的一般生长状况。图 9 和图 11 利用同一时期长度、干重的实测值与模拟值画出散点图，与 $y=x$ 线性公式拟合，得出 R^2 分别为 0.936、0.963。

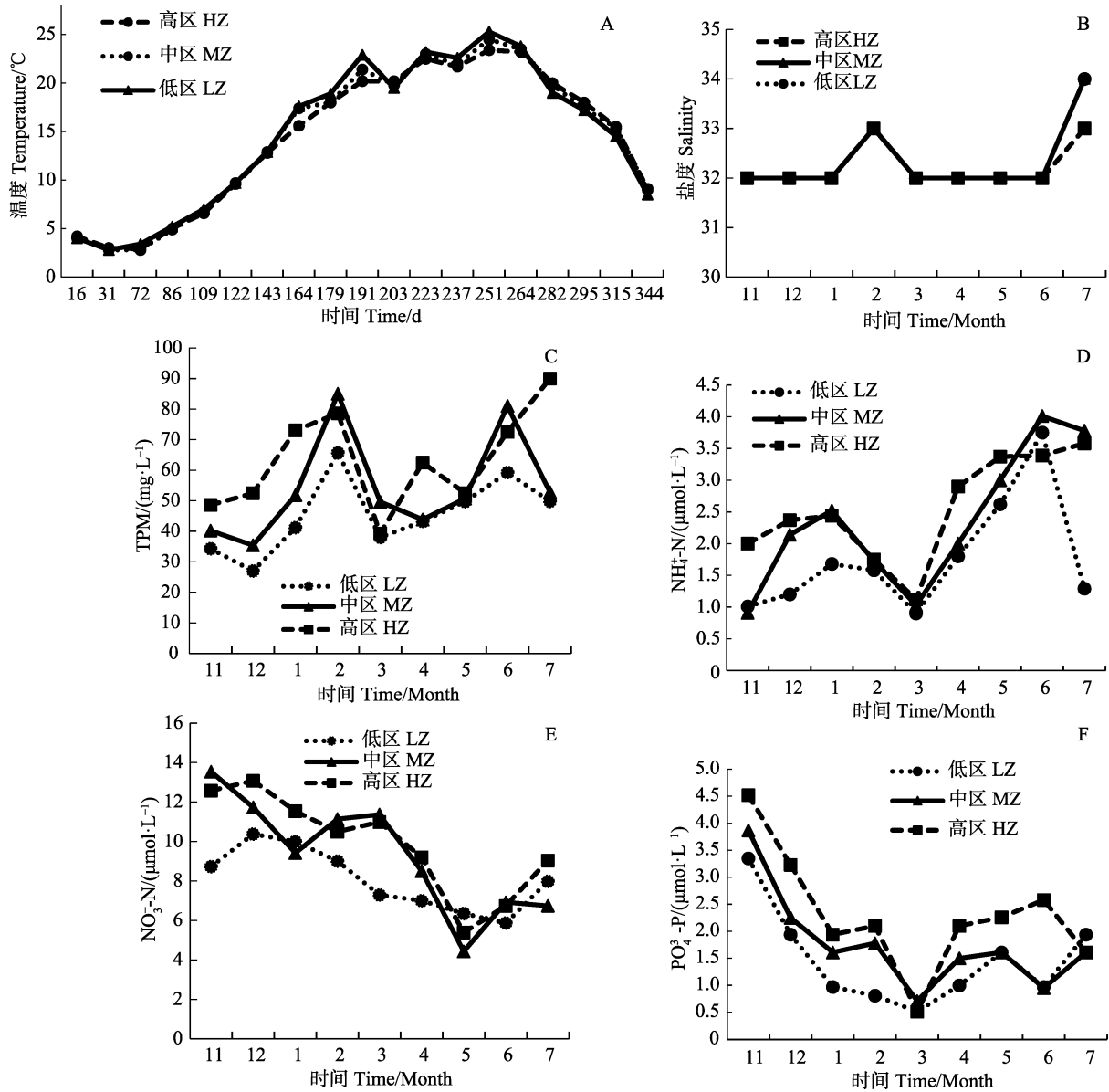


图 4 桑沟湾高、中、低区 2016~2017 年环境测量值
Fig.4 Time-series environmental variables in HZ, MZ, LZ of Sanggou Bay 2016~2017

A: 温度, B: 盐度, C: TPM, D: $\text{NH}_4^+\text{-N}$, E: $\text{NO}_3^+\text{-N}$, F: $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$
A: Temperature, B: Salinity, C: TPM, D: $\text{NH}_4^+\text{-N}$, E: $\text{NO}_3^+\text{-N}$, F: $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$

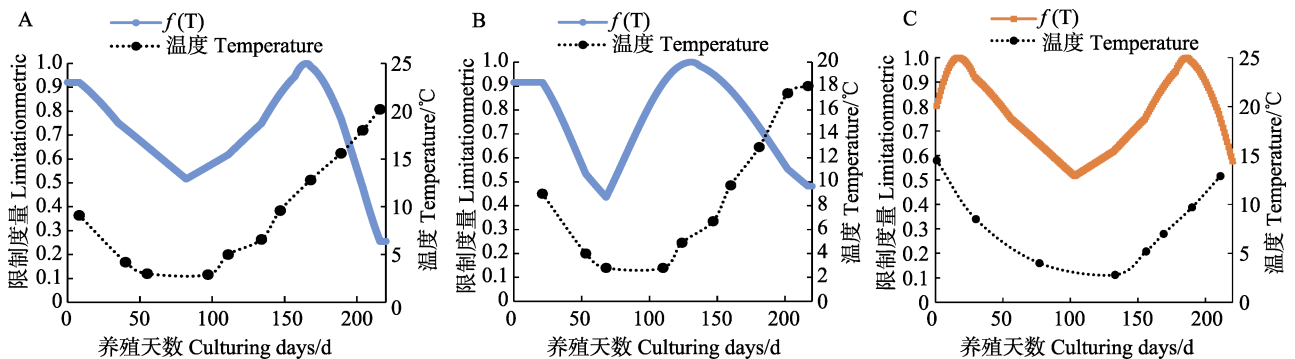


图 5 温度强制函数变化曲线 $f(T)$ 高区(A)、中区(B)、低区(C)
Fig.5 Temperature forcing function curve $f(T)$ HZ(A), MZ(B) and LZ(C)

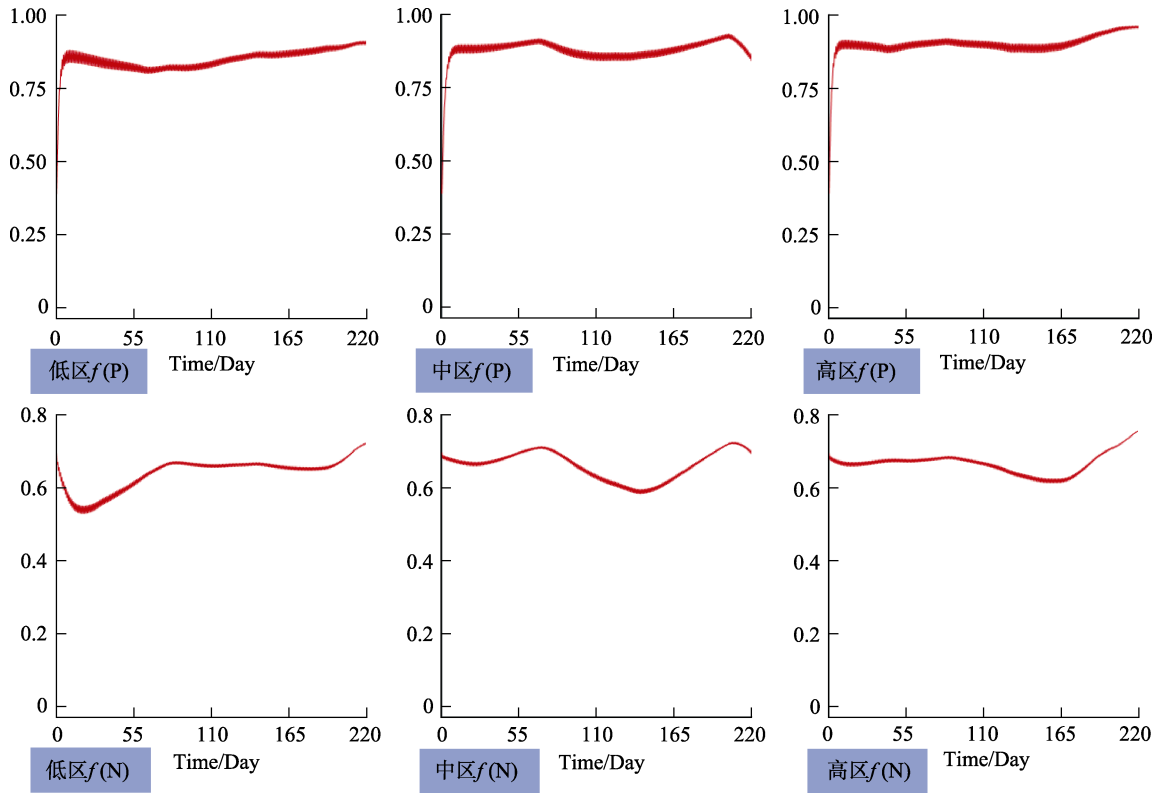


图6 磷强制函数变化曲线 $f(P)$ 及氮强制函数变化曲线 $f(N)$
 Fig.6 P forcing function curve and N forcing function curve

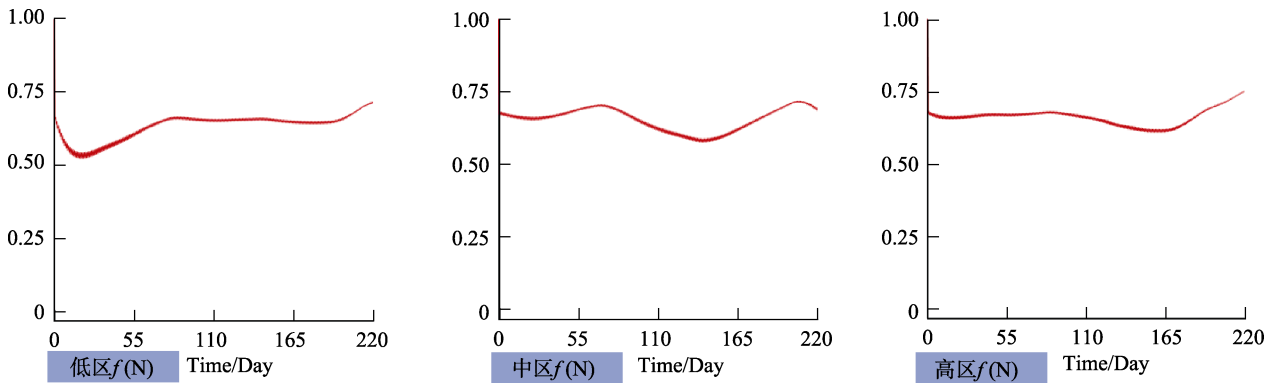


图7 N、P 强制函数变化曲线 $f(NP)$
 Fig.7 N and P forcing function change curve

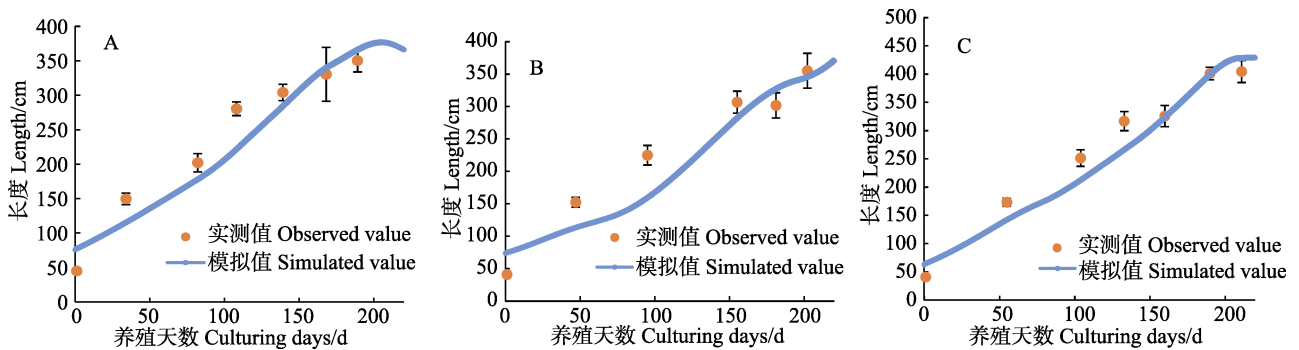


图8 高区(A), 中区(B), 低区(C)海带长度模拟值与实测值
 Fig.8 Comparison of simulated and observed kelp length growth of HZ(A), MZ(B) and LZ(C)

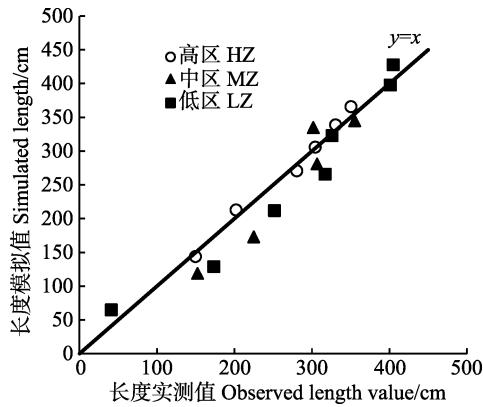


图 9 海带干重模拟值与实测值间的线性回归($y=x$)
Fig.9 Linear regression ($y=x$) of simulated with observed values of length of kelp

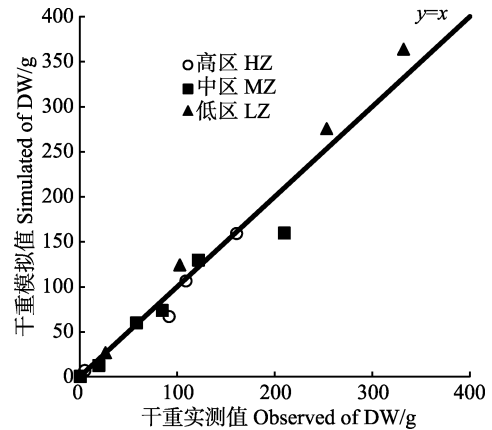


图 11 海带干重模拟值与实测值间的线性回归($y=x$)
Fig.11 Linear regression ($y=x$) of simulated with observed values of dry weight of kelp

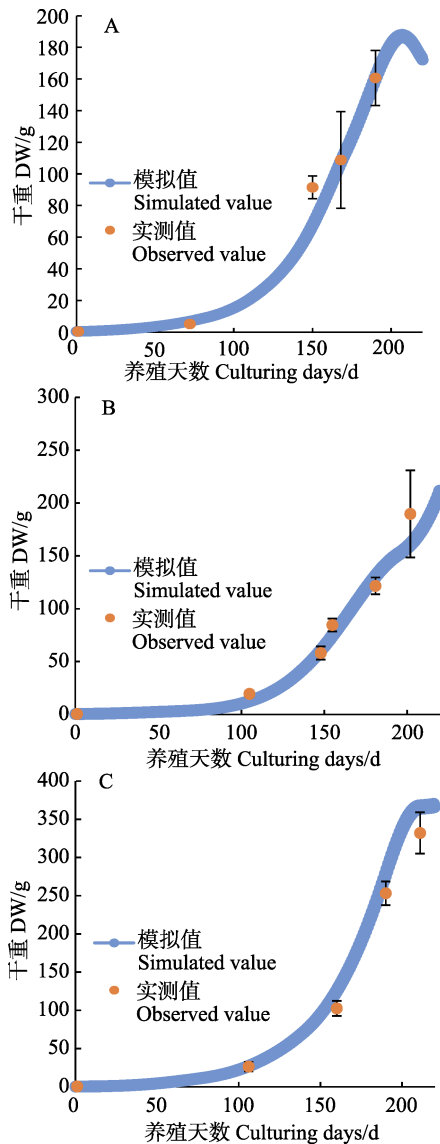


图 10 高区(A)、中区(B)、低区(C) 海带干重模拟值与实测值
Fig.10 The simulated values and observed kelp dry weight values of HZ(A), MZ(B) and LZ(C)

3 讨论

本研究选取了在水深、温度、光照、流速和营养盐等方面都有较显著差异的高、中、低区 3 个采样点, 作为海带生长模型的预测对象, 目的是更加准确地模拟环境因子变化对海带个体生长的影响, 进一步验证模型的准确性。以往的藻类生长模型并未考虑同一海域中不同区域的环境差异, 因此具有一定的局限性。根据高、中、低区海带生长环境参数以及海带干重、长度的测量结果, 我们发现低区比中区的海带生长情况好, 中区次之。本研究野外调查发现, 高区流速较大, 海流的波动对水体和海床扰动使海水浑浊, 降低了海带表面的光照强度; 低区风浪较小, 水体透明度高, 海带受到海水的扰动较少且接收到的光辐照能量较多, 有利于干物质的积累。其次, 海流较大会使海带边缘较脆嫩的部分发生断折, 加速海带叶片的腐烂。此外, 不同的养殖区放苗期、收获期不同, 高区收获期最晚, 此时海水温度较高, 可能影响了海带的生长。

海带的叶片腐烂是其特有的重要生理过程, 贯穿于整个孢子体生长期, 但不同时期的腐烂程度不同 (Li *et al*, 2007)。吴荣军等(2009)的海带生长模型未加入腐烂作用影响, 因此, 不能很好地反映海带生理过程; Zhang 等(2016)对于海带生长模型的研究中虽然考虑了海带腐烂, 但只设置了固定的腐烂数值, 未考虑环境变化对腐烂的影响, 模拟结果不够客观。本研究将海带腐烂作用公式化, 建立了海带腐烂与温度的关系, 完善了海带腐烂的消耗过程模拟。因此, 本研究的模型更加合理。模型在光照强制函数构建过程中, 考虑了桑沟湾养殖区全年的晴日天、阴雨天以及日照时长的影响, 使光照更为接近桑沟湾的实际情况, 这也是其他藻类模型所忽略的一项。

本研究建立的海带个体模型可以较好地模拟海带在不同环境条件下的生长状况。其中部分模拟值在生长后期略低于实测值,推测是海带在生长后期藻体叶片较为宽大,产生光照自遮蔽效应。与此同时,模型中未加入流速对于海带个体生长过程的影响,有可能影响了模型的准确性。张定民等(1986)发现,流速0.01~0.83 m/s为海带生存范围,而实测桑沟湾海区的流速为0.1~0.5 m/s,应不会对本研究中海带个体生存造成影响。但是流速对海带长度、干重等具体生长情况的影响迄今未见报道。为了改进和完善个体生长模型,尚需对流速作用于海带生长过程的机理做进一步研究。

模型中的参数主要根据文献中的数据进行校正,部分文献中参数研究区域不在桑沟湾,由于环境条件存在一定差异,有可能会造成部分模拟值与实测值的偏差。我们认为,模型的建立要综合考虑环境因素并结合模拟物种生物学特征以确定相关参数,从而更好地发挥模型的预测作用。

目前,本研究中建立的海带个体生长模型可作为子模型整合到模拟桑沟湾水产养殖生态系统的综合模型中,为实现基于桑沟湾生态系统的空间规划管理提供技术支持。

参 考 文 献

- Chen GL, Wang DS. Experience in pilot production management of kelp farming. *China Fisheries*, 1958(4): 10 [陈根禄, 王东室. 海带养殖试点生产管理中的几点体会. *中国水产*, 1958(4): 10]
- Duarte P, Meneses R, Hawkins AJS, *et al.* Mathematical modelling to assess the carrying capacity for multi-species culture within coastal waters. *Ecological Modelling*, 2003, 168(1): 109–143
- EPA (Environmental Protection Agency, USA). Rates, constants, and kinetics formulations in surface water quality modeling. Research, 1985: 455
- Ferreira JG, Ramos L. A model for the estimation of annual production rates of macrophyte algae. *Aquatic Botany* 1989, 33(1): 53–70
- Ji ZQ. Study on nearshore ecological remediation of nitrogen and phosphorous pollution and bioenergy extraction from macroalgae. Master's Thesis of Zhejiang University, 2011, 71–73 [季仲强. 近岸海域氮磷污染生态修复与大型海藻生物能源提取研究. 浙江大学硕士研究生学位论文, 2011, 71–73]
- Li JY, Murauchi Y, Ichinomiya M, *et al.* Seasonal changes in photosynthesis and nutrient uptake in *Laminaria japonica* (Laminariaceae: Phaeophyta). *Aquaculture Science*, 2007, 55: 587–597
- Liu JW, Hong CL, Liu HP, *et al.* Regional differences of large algal nutrient elements and their potential models for the restoration of ecological environment. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2017, 45(8): 264–268 [刘嘉伟, 洪春来, 刘会萍, 等. 大型海藻营养元素的区域性差异及其修复生态环境的潜在模式. *江苏农业科学*, 2017, 45(8): 264–268]
- Marianne Alunno-Bruscia, van Der Veer HW, Kooijman SALM. The Aquadeb project (phase i): Analysing the physiological flexibility of aquatic species and connecting physiological diversity to ecological and evolutionary processes by using dynamic energy budgets. *Journal of Sea Research*, 2009, 62(2–3): 43–48
- Martins I, Marques JC. A model for the growth of opportunistic macroalgae (*Enteromorpha* sp.) in tidal estuaries. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2002, 55(2): 247–257
- Mizuta H, Maita Y, Yanada M. Seasonal changes of nitrogen metabolism in the sporophyte of *Laminaria japonica* (Phaeophyceae). *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1994, 58: 2345–2350
- Mizuta H, Ogawa S, Yasui H. Phosphorus requirement of the sporophyte of *Laminaria japonica* (Phaeophyceae). *Aquatic Botany*, 2003, 76(2): 117–126
- Parsons TR, Takahashi M, Hargrave B. *Biological Oceanographic Processes*. Oxford, 1973, 186pp
- Radach G, and Moll A. Estimation of the variability of production by simulating annual cycles of phytoplankton in the central North Sea. *Progress in Oceanography*. 1993, 31(4): 339–419
- Jørgensen SE, *et al.* *Ecological model foundation*. Beijing: Higher Education Press, 2008: 158–165 [扬戈逊等. 生态模型基础. 北京: 高等教育出版社, 2008: 158–165]
- Shen SF. Bioremediation of *Laminaria japonica* and the establishment of its Gametophyte Clones. Master's Thesis of Fujian Normal University, 2013, 25–29 [沈淑芬. 海带的生物修复作用及无性繁殖系的建立. 福建师范大学硕士研究生学位论文, 2013, 25–29]
- Sies H. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, 1993, 215(2): 213–219
- Solidoro C, Pecenic G, Pastres R, *et al.* Modelling macroalgae (*Ulva rigida*) in the Venice lagoon: Model structure identification and first parameters estimation. *Ecological Modelling*, 1997, 94(2–3): 191–206
- Steele JH. Environmental control of photosynthesis in the sea. *Limnology and Oceanography*, 1962, 7(2): 137–150
- Suzuki S, Furuya K, Kawai T, *et al.* Effect of seawater temperature on the productivity of *Laminaria japonica* in the Uwa Sea, southern Japan. *Journal of Applied Phycology*, 2008, 20(5): 833–844
- Wang H, Li LY. The development of algae growth model based on hydrodynamics in small and medium-sized reservoir and the simulation studies on the on the algae blooms. *Energy Environmental Protection*, 2012, 26(1): 21–25 [汪浩, 李玲燕. 基于水动力学的中小水库藻类生长模型及蓝藻暴发的模拟. *能源环境保护*, 2012, 26(1): 21–25]
- Wang WL. Determination of ammonia nitrogen in water by nessler's reagent colorimetric method. *Environmental Monitoring in China*, 2009, 25(1): 29–32 [王文雷. 纳氏试剂比色法测定水体中氨氮影响因素的探讨. *中国环境监测*, 2009, 25(1): 29–32]
- Wu RJ, Zhang XL, Zhu MY, *et al.* A model for the growth of Haidai (*Laminaria Japonica*) in aquaculture. *Marine*

- Science Bulletin, 2009, 28(2): 34–40 [吴荣军, 张学雷, 朱明远, 等. 养殖海带的生长模型研究. 海洋通报, 2009, 28(2): 34–40]
- Yao HQ. Biological characteristics of a new *Saccharina* “Haitian No. 1”. Master’s Thesis of Shanghai Ocean University, 2016, 11–15 [姚海芹. “海天1号”海带新品系生物学特征的研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016, 11–15]
- Zeng CK, Wu CY, Ren GZ. The influence of temperature on the growth and development of the Haidai (*Laminaria Japonica*) gametophytes. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1962, 4(1): 22–28 [曾呈奎, 吴超元, 任国忠. 温度对海带配子体的生长发育的影响. 海洋与湖沼, 1962, 4(1): 22–28]
- Zhang DM, Liao GR, Yang QM. Research on the relationship between the coastal current and *Laminaria japonica* raising II: an experiment of comparison between the current speed and *Laminaria japonica* growth. *Journal of Shandong College of Oceanology Natural science*, 1982(3): 73–79 [张定民, 缪国荣, 杨清明. 沿岸流与海带养殖关系的研究II: 流速对海带生长的影响. 山东海洋学院学报(自然科学版), 1982(3): 73–79]
- Zhang JH, Wu W, Ren JS, et al. A model for the growth of mariculture kelp *Saccharina japonica* in Sanggou Bay, China. *Aquaculture Environment Interactions*, 2016, 8: 273–283
- Zhang QX. Relationship between kelp growth and light. *China Fisheries*, 1994(6): 34–35 [张起信. 海带生长与光照的关系. 中国水产, 1994(6): 34–35]
- Zhang WX. Sanggou Bay mariculture. Beijing: Ocean Press. 1992: 59–68 [张为先. 桑沟湾增养殖. 北京: 海洋出版社. 1992: 59–68]

(编辑 江润林)

Model Simulated Growth of Kelp *Saccharina japonica* in Sanggou Bay

CAI Biying^{1,2,3}, ZHU Changbo⁴, LIU Hui^{2,3①}, CHANG Lirong⁵, XIAO Luyang⁵, SUN Qianwen^{1,2,3}, LIN Fan^{2,3}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 4. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300; 5. Weihai Changqing Ocean Science & Technology Co., Ltd, Rongcheng 264316)

Abstract *Saccharina japonica* is a major economically important brown macroalgae. It is an important primary producer in the marine ecosystem and is also cultured under long-line in coastal northern China. The aim of this work was to develop an individual growth model capable of simulating the growth of the large-scale raft-cultured kelp in the north of China. The model can provide data support, to some extent, to northern kelp farming. The key processes for kelp growth and its relationship with environmental parameters were analyzed, using the Sanggou Bay aquaculture zone as the study area. We used the visualization model software STELLA, which simulated and predicted the growth of the length and dry weight of kelp. The individual growth model basic framework was $N_{\text{growth}} = G_{\text{growth}} - \text{resp} - E_{\text{kelp}}$, where, net growth was defined as gross growth minus respiration and erosion consumption. The gross growth of kelp was defined as a function of light, temperature, salinity, and internal nutrient (N and P) content in kelp, whereas the light parameters were obtained from the Sanggou Bay meteorological records, and salinity, temperature, and nutrient (N and P) measurements were observed at the site in Sanggou Bay. According to the model simulated results, model predictions are well within the observed results. The individual growth model simulated the length results and measured values of the kelp, with the fitting degree R^2 in the high, medium, and low zones as 0.936, whereas dry weight simulated results and measured values of the kelp had fitting degree R^2 in the high, medium, and low zones as 0.963. According to the results, the model can accurately reflect the true growth process of kelp. A reliable individual growth model is the basis for the assessment of aquaculture carrying capacity. In addition, the individual growth model may provide a scientific foundation for aquaculture spatial planning and management.

Key words Sanggou Bay; Kelp; Individual growth model; Environmental conditions; STELLA

① Corresponding author: LIU Hui, E-mail: liuhui@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180427002

http://www.yykxjz.cn/

王震林, 朱建新, 曲克明, 陈世波. 水力停留时间对厌氧反应器脱氮效果的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(3): 42-49
Wang ZL, Zhu JX, Qu KM, Chen SB. The impact of hydraulic retention time on an anaerobic reactor's nitrogen removal effect. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(3): 42-49

水力停留时间对厌氧反应器脱氮效果的影响*

王震林^{1,2} 朱建新^{2①} 曲克明² 陈世波³

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 农业农村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. 青岛卓越海洋集团 青岛 266408)

摘要 本研究使用自主设计的厌氧反硝化器,以斜发沸石为填料,自然挂膜,与循环水养殖系统一级生物滤池串接,探索不同水力停留时间(HRT)下反应器的脱氮效果。结果显示,在实验过程中,反应器对无机氮(IN)、总氮(TN)均有较好的去除效果。在低水力停留时间(HRT<7.43 h)下,反应器主要去除的是氨氮(NH₄⁺-N);高水力停留时间下(HRT≥7.43 h),反应器主要去除的是硝酸盐氮(NO₃⁻-N)。当 HRT 为 17.52 h 时,反应器的脱氮效果最好,NO₃⁻-N 去除率为 77.48%。此后, HRT 延长,脱氮效果下降。脱氮效果越好,亚硝酸盐氮(NO₂⁻-N)、NH₄⁺-N 积累越严重,NO₂⁻-N 最先开始积累。本研究可为厌氧反硝化装备的开发提供参考。

关键词 厌氧反应器;脱氮效果;流速;水力停留时间;自然挂膜

中图分类号 S969.38; X703.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)03-0042-08

工厂化循环水养殖模式因具有养殖环境可控、节水节地、单位水体产量高、养殖操作简便、对环境污染小等诸多优点,受到广泛认可,最近十几年在中国各地得到了迅速发展及普及。由于现行的水处理系统缺乏专门的反硝化设备,存在硝酸盐氮(NO₃⁻-N)积累的问题。为了降低 NO₃⁻-N 含量,在养殖生产中需要大量换入新水,导致水体利用率降低。采用微生物降解、转化水体中的氮素被认为是可行的。厌氧反硝化在诸多生物脱氮模式中,因脱氮效率高、反应条件控制和反应机理研究都比较成熟,日益受到重视。目前,国内多使用实验室人工配置的模拟养殖废水进行厌氧反硝化研究(赖才胜等, 2010; 谭洪新等, 2010; 唐成婷等, 2014; 董明来等, 2011; 罗国芝等, 2013),水产养殖生产上应用反硝化脱氮的报道较少。国外对其研究已进入中试阶段(Lepine *et al.*, 2016)。应用厌氧反硝化

脱氮的难点首先是养殖废水的溶解氧(DO)通常在 5.0 mg/L 左右,而反硝化要求 DO<0.5 mg/L (辛明秀等, 2007),可使用氮气曝气或适当延长水力停留时间(HRT)来解决(李秀辰等, 2006);其次是养殖废水的碳氮比(C/N)较低,而反硝化要求 C/N 达到 3~6,甚至更高,且比值越高(3<C/N<30)反硝化效果越明显(卢文显等, 2015)。因此,需要选择一种合适的碳源,既稳定、高效释碳、提高 C/N,又不对养殖动物产生毒害作用。可采用的方式是使用可生物降解聚合物(BDPs) (周子明等, 2015; 罗国芝等, 2011)或农产品废弃物等(李华等, 2016)作为碳源和生物膜载体;将硝化与反硝化串接,以养殖废水中的有机物作为碳源(Boley *et al.*, 2000);采用养殖固体废弃物或其水解产物作为碳源(李秀辰等, 2010; 成小婷等, 2016; Philips *et al.*, 1998)等。

* 国家重点研发计划设施水产养殖智能化精细生产管理技术装备研发项目(2017YFD0701700)资助[This work was supported by the National Key Research and Development Program Facility Aquaculture Intelligent and Fine Production Management Technological Equipment Development (2017YFD0701700)]. 王震林, E-mail: 864806597@qq.com

① 通讯作者: 朱建新, 研究员, E-mail: zhujx@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-04-27, 收修改稿日期: 2018-05-14

本研究将厌氧反应器(以下简称反应器)与一级生物滤池相接,以养殖废水中的有机物作为碳源,通过调节反应器出水流量,延长 HRT,降低 DO,研究各因素与反硝化效果的关系,为后续厌氧反硝化设备的研发提供参考。

1 材料与方法

1.1 外挂式厌氧反应器的结构特点

实验地点位于山东青岛黄岛区琅琊镇卓越海洋集团的圆斑星鲽(*Verasper variegates*)养殖车间。反应器的外形尺寸见图1。采用亚克力材料,外涂水产用油漆,避免光照影响反硝化效果。反应器内径为50 cm,底座到上法兰盘上表面高为180 cm,每隔40 cm设1个取样口(取样口1、取样口2、出水口),反应器从底部侧面进水,最底部设1个排污阀;取、出水口外径为2.0 cm,进水口、气体逸出管、底排污管外径为3.3 cm。在反应器上部背光处留1个20 cm竖条状水位观察带,用于观察反应器内工作情况、测量不同运行条件下的水位,未用时,用遮光带封好。填料全部采用斜发沸石颗粒,平均粒径约为8 mm×6 mm×5 mm,装填总高度为117 cm,总重量为251.32 kg。

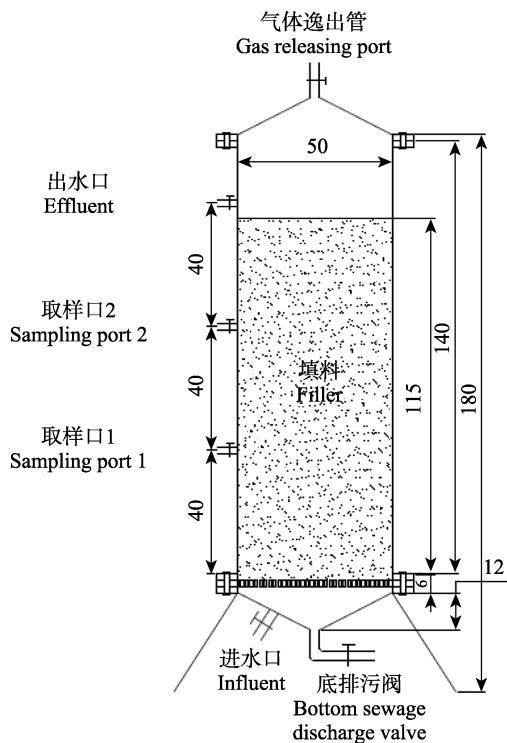


图1 反应器的结构

Fig.1 The structure diagram of the reactor (cm)

1.2 实验方法

1.2.1 厌氧反应器挂膜与实验时间 王威等(2013)

研究表明,反硝化反应器挂膜时间最长需要40 d,也有研究认为,在海水养殖系统中,直接挂膜建立硝化系统分别需要40~80 d(罗国芝等,2005)和73 d(梁洋洋等,2012),所以,将反应器的挂膜时间暂定为70 d左右。从2017年4月21日开始挂膜,于6月29日取反应器进、出水口水样进行测定。结果显示,氨氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$)、亚硝酸盐氮($\text{NO}_2^-\text{-N}$)、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 去除率分别为63.11%、85.71%、-21.82%(积累),此时,认为反应器发生了硝化作用,结束挂膜,可以开始实验。

挂膜期间,测定反应器的实际外形尺寸,填料容重(单位体积填料重量,以 g/cm^3 计),测量反应器自填料层顶端以下的海水体积,为后续根据水位计算反应器内的海水体积及根据流量计算HRT做准备。正式挂膜前,排空反应器内空气,关闭底排污阀、取样口1和取样口2,调节好出水流量,将出水口所接水管和气体逸出管浸没于水中,以隔绝空气的进入。实验时间为2017年6月29日~8月29日,实验期间,检测了6组不同流量(642.11、612.46、342.12、24.71、10.48和5.40 L/h,对应的HRT分别为0.21、0.25、0.54、7.43、17.52和34.04 h)下各取样口(进水口、出水口、取样口1和取样口2)、出水口及进水口的相关水质参数。每隔10 d取样1次,取样后关闭取样口1和取样口2,调节反应器出水阀门,改变出水流量,现场测定水位、流量、温度、盐度、pH和DO,所有样品带回实验室检测。

1.2.2 水质指标分析方法 测定的主要水质指标:水位、流量、温度、盐度、pH、DO、COD、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、总氮(TN)、总有机碳(Total organic carbon, TOC)、TOC/TN。其中, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 每次测2组平行样品并取平均值,其他指标每次只测1组。温度、盐度、pH、DO使用多参数水质测定仪(556MPS YSI,美国)测定;COD、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的测定参照海洋监测规范第4部分:海水分析(GB/T12763.4-2007),分别采用碱性高锰酸钾法、次溴酸钠氧化法、重氮-偶氮法和锌镉还原法。TOC、TN使用总有机碳分析仪(岛津公司TNM-1,日本)。

1.2.3 数据处理

DO平均值公式:

$$D_{\text{avg}}=(D_{\text{in}}+D_{\text{s1}}+D_{\text{s2}}+D_{\text{ef}})/4 \quad (1)$$

IN值公式:

$$V_{\text{IN}}=V_{\text{Am}}+V_{\text{Ni}}+V_{\text{Na}} \quad (2)$$

去除率公式:

$$R_r=100\% \times (V_i - V_o)/V_i \quad (3)$$

$\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除值公式:

$$V_{\text{am}}=V_{\text{ai}} - V_{\text{ao}} \quad (4)$$

$\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除值在 IN 去除值中占比公式:

$$R_{\text{am}} = 100\% \times V_{\text{am}} / (V_{\text{am}} + V_{\text{ni}} + V_{\text{na}}) \quad (5)$$

式中, D_{avg} 、 D_{in} 、 D_{s1} 、 D_{s2} 、 D_{ef} 分别为 DO 平均值(mg/L)、进水口 DO (mg/L)、取样口 1 中 DO (mg/L)、取样口 2 中 DO (mg/L)、出水口 DO (mg/L); V_{IN} 、 V_{Am} 、 V_{Ni} 、 V_{Na} 分别为无机氮(IN)值、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 值、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 值、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 值; R_r 、 V_i 、 V_o 分别为去除率(%)、进水值(mg/L)、出水值(mg/L)。 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、IN、TN 去除率计算以相应值代入即可; V_{am} 、 V_{ai} 、 V_{ao} 分别为 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除值、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 进水值、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 出水值, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的去除值按公式 4 类推; R_{am} 、 V_{am} 、 V_{ni} 、 V_{na} 分别为 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 在 IN 去除值中占比(%), $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除值、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 去除值、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 去除值(mg/L), $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 去除值在 IN 去除值中占比按公式 5 类推。

2 结果

2.1 pH、温度、盐度变化

从图 2a 中可以看出, 在同一 HRT 下, 反应器不同取样口的 pH 有较小幅度的波动, 总体变化不大, 整个实验阶段的 pH 大体相当, 处于 6.8~7.4 之间。从图 2b 中可以看出, 实验期间的温度、盐度(20.80~22.54°C、30.48~31.21)都有较小范围的波动。

2.2 不同水力停留时间的溶解氧变化

从图 3a 可以看出, 反应器各取样口按进水口到出水口的顺序排列, 随着 HRT 的增加, DO 的走势变陡, 与进水口 DO 的波动无关; 当 $\text{HRT} \geq 0.54$ h 时, 出水口 DO 均降到 0.5 mg/L 左右或以下(分别为 0.51、0.28、

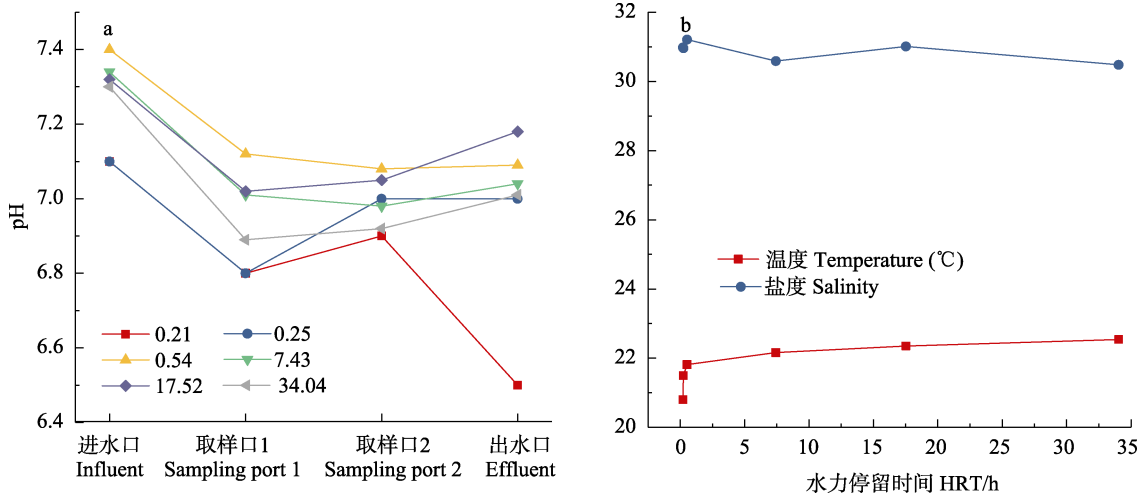


图 2 不同 HRT 下的 pH、温度、盐度变化(h)

Fig.2 Changes of pH, temperature and salinity under different hydraulic retention times (h)

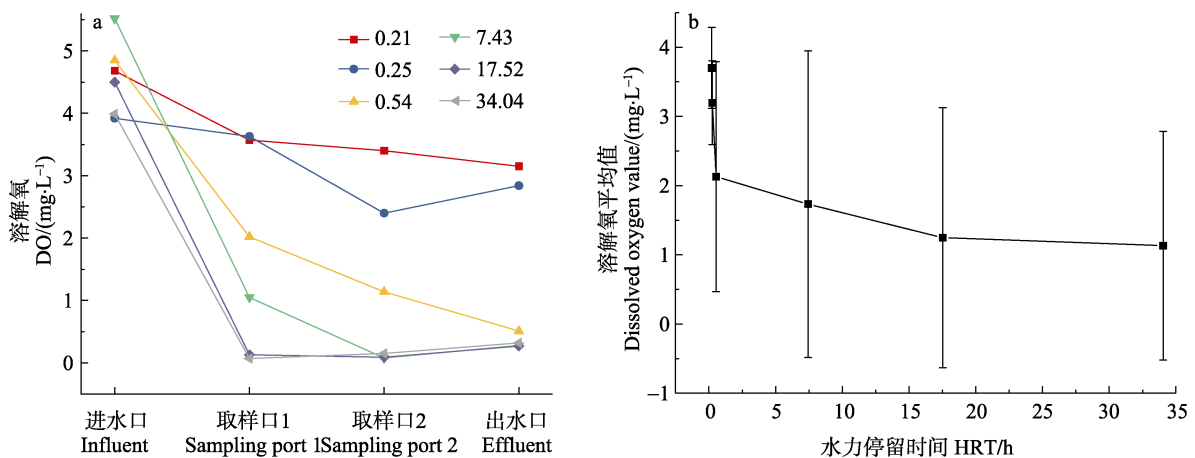


图 3 不同 HRT 下反应器各取样口的 DO 以及 HRT 和 DO 平均值的变化(h)

Fig.3 The dissolved oxygen value of each sampling port of the reactor under different hydraulic retention time and the changes of mean dissolved oxygen value versus hydraulic retention times (h)

0.27、0.32 mg/L); 从图 3b 可以看出, 随着 HRT 的增加, 反应器的平均 DO 也急剧下降。结合图 3a 可以看出, 由于反应器的 DO 走势随着 HRT 的增加而变陡, 导致在相应的 HRT 下, DO 的平均值也迅速下降。

2.3 不同水力停留时间下无机氮、总氮、氨氮、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮的去除效果

从图 4 可以看出, 整个实验期间, 反应器对 IN、TN 均表现有效的正去除; 随着 HRT 的增加, $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 去除率呈先小幅上升再大幅下降趋势, 然后, 再缓慢上升, 呈反 ‘S’ 型变化。 $\text{NO}_3\text{-N}$ 去除率呈先增大后再减小趋势; 从负去除(积累)到正去除, 在 HRT 为 17.52 h 时达到最大(77.48%), 到 34.04 h 反而减小。结合 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 的去除情况可以看出, 当以 $\text{NO}_3\text{-N}$ 去除率从小到大排序, 去除率达到一定值后, $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 开始出现积累(当 HRT=17.52 h, 二者都出现积累; 当 HRT=34.04 h, 后者积累, 前者正去除), 并且 $\text{NO}_3\text{-N}$ 去除率越高, 积累越严重; 在积累顺序上表现为先 $\text{NO}_2\text{-N}$ 后 $\text{NH}_4\text{-N}$ 。

2.4 不同水力停留时间下反应器各取样口相关水质指标的变化

从图 5 可以看出, DO、COD、TN、TOC/TN

的变化与 $\text{NO}_3\text{-N}$ 的变化无明显相关性。整个实验期间, TOC/TN 的变化范围为 0.61~2.48, 绝大多数在 1.0~1.5 之间。 $\text{NO}_3\text{-N}$ 在各取样口变化曲线与 TOC 变化曲线的关系非常密切, 其规律为 TOC 增高或下降, $\text{NO}_3\text{-N}$ 下降或上升。其中, 当 HRT 为 0.25、0.54、

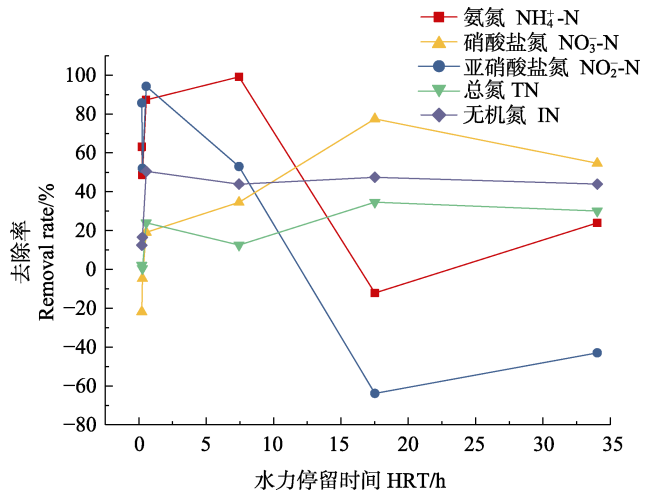


图 4 不同 HRT 下无机氮、总氮、氨氮、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮的去除率

Fig.4 The removal rate of inorganic nitrogen, total nitrogen, ammonium, nitrite and nitrate under different hydraulic retention times

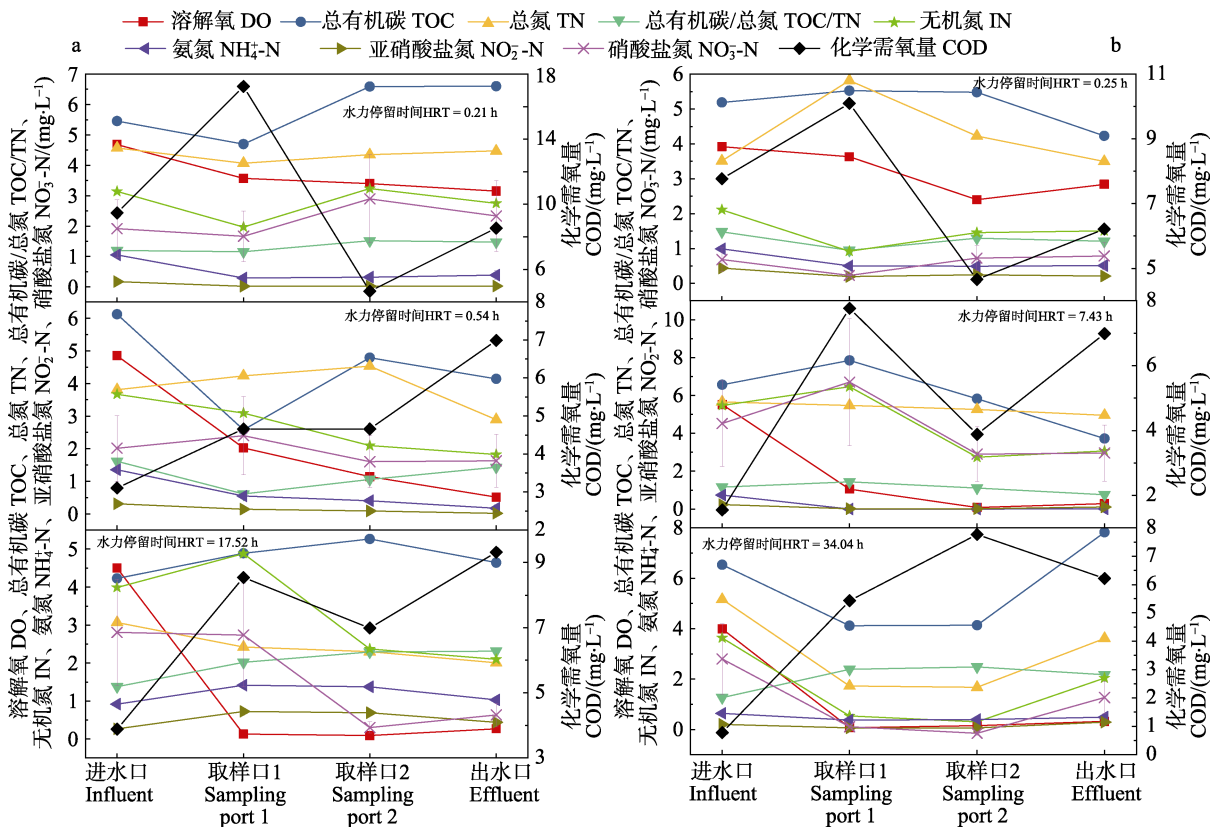


图 5 不同 HRT 下反应器各取样口相关水质指标的变化

Fig.5 Changes of water quality indexes of each sampling port of the reactor under different hydraulic retention times

17.52 h 时, 二者关系体现得最为明显。

2.5 不同水力停留时间下氨氮、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮去除值在无机氮去除值中占比

从图 6 可以看出, 已知反应器在整个实验过程中, 对 IN 均表现为正去除, 对 NO_3^- -N 表现为先积累后去除。当 HRT 为 0.21、0.25 h 时, NO_2^- -N 去除值在 IN 去除值中占比为 37.48% 和 37.67%, 在图 6 中出现重叠。从图 6 可以看出, 反应器在低 HRT (<7.43 h) 下, 脱去的氮素主要是 NH_4^+ -N 和 NO_2^- -N, 在高 HRT (≥ 7.43 h) 下, 脱去的氮素主要是 NO_3^- -N。随着 HRT 的增大, 该效果呈先增大后减小趋势。

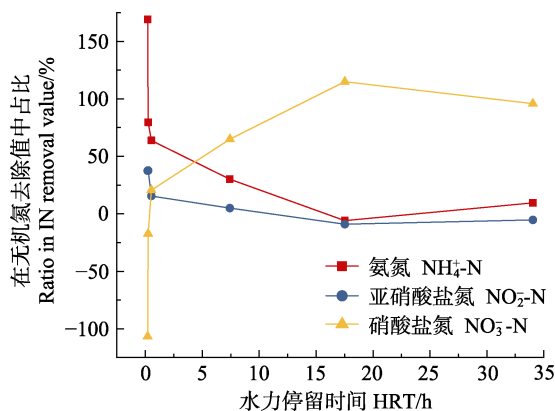


图 6 不同 HRT 下氨氮、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮去除值在无机氮去除值中占比

Fig.6 The ratio of ammonium, nitrite and nitrate removal value in inorganic nitrogen removal value at different hydraulic retention times

3 讨论

3.1 氨氮、亚硝酸盐氮出现积累的原因分析

3.1.1 依据填料上附着有机物差异的分析 从图 3a 和图 4 可以看出, 当 $\text{HRT} \geq 0.54$ h 时, 出水口 DO 均降到 0.5 mg/L 或以下, 反应器开始有厌氧反硝化效果, 这与辛明秀等(2007)、李秀辰等(2006)的研究结果相一致。从图 5 可以看出, 随着 HRT 的增大($\text{HRT} \geq 0.54$ h), 反应器出现一定的反硝化效果, 但主要反硝化层集中于反应器的某一段填料层中, 而其上的填料层反硝化效果明显降低, 甚至出现 NO_3^- -N 浓度的反增。当 HRT 为 17.52、34.04 h 时, 表现非常明显。当 HRT 为 17.52 h 时, 反应器取样口 1、取样口 2 和出水口的 DO 分别为 0.13、0.09 和 0.27 mg/L, 都符合反硝化厌氧条件。3 个取水口在 pH、温度、COD、TOC/TN、DO 等各项指标均无显著差异, 但 NO_3^- -N 的去除却主要集中于取样口 1 至取样口 2 的填料间, 在这段填料中, NO_2^- -N(0.73→0.69 mg/L)、

NH_4^+ -N (1.42→1.38 mg/L) 只是小幅降低, 且浓度并不高, 此后, 从取样口 2 到出水口, NO_2^- -N 和 NH_4^+ -N 降低的幅度都不大, 但 NO_3^- -N 反而增高。可见, 在同一 HRT 下, 尽管 DO、C/N 等反硝化的关键指标都大致相同, 但不同填料层反硝化效果差异明显, 这从所测数据上无法直接找出原因。

实验结束, 在拆除反应器取出其中填料的过程中发现, 在反应器中, 以取样口 1、取样口 2 的中间位置为分层面, 其上的填料仍然与填料刚装填时被反复水洗后的颜色一致; 其下的填料, 越向下颜色越深, 最后呈深棕褐色, 与生物滤池底的污泥颜色一致, 但该污泥已被除去臭味。这些沉积在填料上深褐色泥样均匀分布的物质, 是进水中碎化、溶解的残饵和粪便等有机物逐渐积累造成的, 它不但可为反应器内各种耗氧、反硝化的微生物提供溶解或微颗粒状有机物, 并可以极大地增加微生物的丰度和消耗水中的溶氧。在实验室检测 TOC 和 TN 时, 由于仪器检测的需要, 在水样加装前都必须经过过滤处理, 因此, 不同填料层有机物量的差异在检测结果上无法真实地被表达出来。HRT 为 17.52 h 时, 取样口 1、取样口 2 和出水口在其他指标上均相近, 但不同填料层上有机物附着量的差异, 可能是导致同一 HRT 下反应器内不同填料层反硝化能力差异的根本原因。另外, 随着 HRT 的增大, 流量减小, 下层填料与养殖废水中有机物的接触时间增加, 有机物沉积和被吸附的量也增加, 反应器内主要反硝化层下移; 上层填料因有机物的“储备”量太少, 微生物丰度不够, 流经该层的养殖废水中有机物也不足, 导致 NO_3^- -N 在该层无法有效地去除, 出现积累, 从而整个反应器反硝化效果下降。

3.1.2 依据各取样口水质指标的分析 有机物和有机物形态的 N 在反应器内都要经过被消耗的过程。其中, 有机物形态的 N 要经过先氨化变成 NH_4^+ -N, 再经硝化从 NH_4^+ -N 或 NO_2^- -N 转化为 NO_3^- -N 的过程, 最后, 经过反硝化从 NO_3^- -N 逐步转化为以 N_2 (NO_3^- -N→ NO_2^- -N→NO→ N_2O → N_2) 为主的气体逸出。这些过程在反应器内都存在, 在不同填料层中随着 HRT、DO、有机物含量而变化。

当 HRT 为 17.52 h 时, 从进水口到取样口 1, DO (4.50→0.13 mg/L) 大幅下降, NH_4^+ -N(0.92→1.42 mg/L)、 NO_2^- -N (0.27→0.73 mg/L) 出现积累, NO_3^- -N (2.81→2.74 mg/L) 小幅下降, TOC (4.23→4.89 mg/L) 上升, TN (3.07→2.42 mg/L) 下降。填料上和流经填料的有机物从下到上递减, 测总氮时, 水样事先过滤, 因此, 所测值为溶解态无机氮和极少量有机氮, 以上数据显示, 在这段填料中, 反硝化作用大于氨化作用, 导致

IN 下降。硝化作用强烈, NO_3^- -N 转化为 NO_2^- -N 大于 NO_2^- -N 向 NO_3^- -N 转化, 使 NO_3^- -N 小幅下降; 有机物向 NH_4^+ -N 转化大于 NH_4^+ -N 向 NO_2^- -N 的转化, NH_4^+ -N、 NO_3^- -N 向 NO_2^- -N 的转化大于 NO_2^- -N 向 NO 、 N_2O 、 N_2 与 NO_3^- -N 的转化, 造成 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N 较大幅度的积累。从取样口 1 到取样口 2, DO (0.13→0.09 mg/L)、 NH_4^+ -N (1.42→1.38 mg/L)、 NO_2^- -N (0.73→0.69 mg/L) 小幅下降, NO_3^- -N (2.74→0.30 mg/L) 大幅下降, TOC (4.89→5.27 mg/L) 继续上升, TN (2.42→2.30 mg/L) 下降。在这段填料中, 反硝化、氨化效果都很强烈, 反硝化效果略大, IN 小幅下降。较多的 NO_3^- -N 被转化为 NO_2^- -N, NH_4^+ -N 向 NO_2^- -N、 NO_2^- -N 向 NO 、 N_2O 、 N_2 与 NO_3^- -N 转化的程度大于有机氮向 NH_4^+ -N、 NH_4^+ -N 和 NO_3^- -N 向 NO_2^- -N 转化的程度, 因此, NH_4^+ -N、 NO_2^- -N 有较小幅度下降。从取样口 2 到出水口, DO (0.09→0.27 mg/L) 反增, 但仍处于反硝化要求以下, NH_4^+ -N (1.38→1.03 mg/L)、 NO_2^- -N (0.69→0.44 mg/L) 继续下降, NO_3^- -N (0.30→0.63 mg/L) 上升, TOC (5.27→4.64 mg/L) 下降, TN (2.30→2.01 mg/L) 继续下降。在这段填料中, 附着的有机物和流经该层填料的有机物都极少, 氨化作用极弱, DO 的反增和 TOC 的减少, 虽抑制了反硝化的强度, 但仍进行着, 导致 TN 减少。 NO_2^- -N 向 NO_3^- -N、 NH_4^+ -N 向 NO_2^- -N 和 NO_2^- -N 向 NO 、 N_2O 、 N_2 、 NO_3^- -N 转化的程度分别大于 NO_3^- -N 向 NO_2^- -N、有机氮向 NH_4^+ -N 和 NH_4^+ -N、 NO_3^- -N 向 NO_2^- -N 转化的程度, 从而导致 NO_3^- -N 的积累, NH_4^+ -N、 NO_2^- -N 的下降。综上所述, 从图 5 可以看出, NO_2^- -N 和 NH_4^+ -N 的积累主要发生在从进水口到取样口 1 之间的填料层, 在这段填料中, 既发生有机氮向 IN 的转化, 消耗有机物和 DO, 还发生反硝化, TN 下降值最大, 脱氮效果最好, 但还可继续提升。在整个实验中, 养殖废水中的 C/N、TOC 浓度都不高, 如果在进水口到取样口 1 的变化过程中, 增加碳源供给量, 或在从取样口 1 到出水口的过程中, 附着的有机物和流经的有机物都减少, 脱氮效率下降。此时, 增加碳源的供给, 可进一步增大反硝化效果, 消除 NO_2^- -N 和 NH_4^+ -N 的积累。

分析在其他 HRT 下反应器内相关水质指标的变化, 也可得出上述结论。反应器内不同填料层有机物附着量的差异和养殖废水在不同填料层有机物供应上的差异, 导致在同一 HRT 下反应器内不同填料层反硝化脱氮效果的差异。HRT 继续增大, 反应器内主要反硝化脱氮层继续下移, 上层填料有机物缺乏的现象更加突出, 反应器总体脱氮效果下降。

3.2 提高反应器脱氮效果的措施

3.2.1 改进反应器外部和内部的设计 在进水口中, 可以根据内部有机物的需要而改变进水管位置, 在运行过程中, 也可以根据需要对不同层的填料进行有机物的“强化”; 在出水口中, 可以根据不同层的出水指标而选择出水口的位置; 在本反应器中, 水流从底部侧面进入, 出水口与各取样口开口都在同一侧, 导致填料中水流路径简捷化、附着的有机物不均匀、填料无法充分利用, 因而降低了脱氮效果。因此, 可在反应器内中间位置设计一块隔板, 使水流在反应器内的流出途径呈“U”型, 从而提高填料的使用效果; 在填料填装前, 可将填料与从生物滤池底收集的或微滤机滤下的污泥预混合, 再进行装填, 使各层填料上的有机物量充足, 从而提高反应器的脱氮效果。

3.2.2 填料的优选或改进 鉴于 BDPs 填料在含盐水体中具有不向水体释放额外的氮、较高的可生物降解性、稳定的释碳性能和 NO_3^- -N 去除能力(Xu *et al.*, 2018a, b; Costa *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2011), 在生产成本可承受的情况下, 部分或全部采用 BDPs 材料作为反硝化的碳源和生物膜载体, 并改进反应器的外形设计, 以方便后续 BDPs 填料的添加, 也是一种可行的解决方案。

4 结论

反应器在整个实验阶段对 IN、TN 表现正去除, 说明采用本研究的反硝化模式进行养殖废水脱氮是可行的。随着 HRT 的增大, 反应器内各层的 DO 迅速下降, 当出水口 DO 降到 0.5 mg/L 或以下时, 反应器开始出现反硝化效果。反硝化效果随 HRT 的增大而增大, 当 HRT 为 17.52 h 时, 脱氮效果最好, NO_3^- -N 去除率达到 77.48%; 继续增大 HRT, 反应器上部的填料层因为有机物附着量少, 流经该层的养殖废水有机物供应量也少, 从而导致反硝化总体效果降低。反应器不同填料层上附着的有机物量存在差异, 需要在外部和内部设计上进行改进, 同时, 也需要在填料装填前进行预处理, 以提高反硝化效果。

参 考 文 献

- Boley A, Muller WR, Haider G. Biodegradable polymers as solid substrate and biofilm carrier for denitrification in recirculated aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*, 2000, 22(1-2): 75-85
- Cheng XT, Luo GZ, Li L, *et al.* Nitrogen and phosphorus removal by simultaneous nitrification and denitrification

- using fermented aquaculture solid waste products as carbon source. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2016, 10(1): 163–168 [成小婷, 罗国芝, 李丽, 等. 以养殖固体废弃物发酵产物为碳源的 SND 系统的脱氮除磷效果. *环境工程学报*, 2016, 10(1): 163–168]
- Costa DD, Gomes AA, Fernandes M, *et al.* Using natural biomass microorganisms for drinking water denitrification. *Journal of Environmental Management*, 2018, 217: 520–530
- Dong ML, Luo GZ, Liu Q, *et al.* Study on the denitrogenate effect and microbial community dynamic change of PBS-filled denitrification reactor. *Environmental Pollution and Control*, 2011, 33(10): 48–54 [董明来, 罗国芝, 刘倩, 等. 聚丁二酸丁二醇酯反硝化反应器的脱氮效果及微生物群落变化研究. *环境污染与防治*, 2011, 33(10): 48–54]
- Lai CS, Tan HX, Luo GZ, *et al.* Denitrification and kinetic characteristics using biodegradable polymers as carbon source and biofilm carrier. *Chinese Journal of Environmental Science*, 2010, 31(8): 1839–1845 [赖才胜, 谭洪新, 罗国芝, 等. 利用可生物降解聚合物为碳源和生物膜载体脱氮及其动力学特性研究. *环境科学*, 2010, 31(8): 1839–1845]
- Lepine C, Christianson L, Sharrer, *et al.* Optimizing hydraulic retention times in denitrifying woodchip bioreactors treating recirculating aquaculture system wastewater. *Journal of Environmental Quality*, 2016, 45(3): 813–821
- Li H, Zhou ZM, Liu QS, *et al.* Research on the denitrification capacity of rice husk as denitrification carbon source in seawater. *Industrial Water Treatment*, 2016, 36(3): 58–61 [李华, 周子明, 刘青松, 等. 稻壳作为反硝化碳源在海水中的脱氮性能研究. *工业水处理*, 2016, 36(3): 58–61]
- Li XC, Li LL, Zhang GC, *et al.* Denitrification of wastewater with external carbon source of solid wastes in recirculating marine culture system. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2010, 26(4): 275–279 [李秀辰, 李俐俐, 张国琛, 等. 养殖固体废弃物做碳源的海水养殖废水反硝化净化效果. *农业工程学报*, 2010, 26(4): 275–279]
- Li XC, Lü SZ, Meng F. Development and application of denitrification in aquaculture system: A review. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2006, 21(4): 366–370 [李秀辰, 吕善志, 孟飞. 利用反硝化技术净化养殖水体的研究进展. *大连水产学院学报*, 2006, 21(4): 366–370]
- Liang YY, Luo GZ, Tan HX, *et al.* Nitrification performance of biological activated carbon packed-bed reactor for treating saline water. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2012, 6(5): 1536–1542 [梁洋洋, 罗国芝, 谭洪新, 等. 生物活性炭填料反应器处理含盐水体的硝化性能. *环境工程学报*, 2012, 6(5): 1536–1542]
- Lu WX, Li M. The potential application of denitrifying bacteria in the treatment of wastewater: Theory and advances. *Journal of Fujian Normal University (Natural Science)*, 2015, 31(3): 111–117 [卢文显, 李敏. 反硝化细菌在废水治理中的应用: 原理与现状. *福建师范大学学报(自然科学版)*, 2015, 31(3): 111–117]
- Luo GZ, Dong ML, Liu Q, *et al.* Denitrification of saline water with poly butylene succinate as carbon source and biofilm carriers. *Environmental Pollution and Control*, 2013, 35(3): 20–25 [罗国芝, 董明来, 刘倩, 等. 以聚丁二酸丁二醇酯为碳源去除含盐水体硝酸盐的研究. *环境污染与防治*, 2013, 35(3): 20–25]
- Luo GZ, Lu L, Du J, *et al.* Current status of the research about the carbon source of the heterotrophic denitrification of recirculating aquaculture system. *Fishery Modernization*, 2011, 38(3): 11–17 [罗国芝, 鲁璐, 杜军, 等. 循环水养殖用水中反硝化碳源研究现状. *渔业现代化*, 2011, 38(3): 11–17]
- Luo GZ, Sun DC, Feng SL, *et al.* The function establishment of biofilter in recirculating commercial fish culture system. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(4): 574–577 [罗国芝, 孙大川, 冯是良, 等. 闭合循环水产养殖系统生产过程中生物过滤器功能的形成. *水产学报*, 2005, 29(4): 574–577]
- Philips JB, Loven G. Biological denitrification using up flow biofiltration in recirculating aquaculture systems: pilot scale experience and implications for full-scale. *Aquacultural Engineering*, 1998(22): 171–178
- Tan HX, Lai CS, Luo GZ, *et al.* Using biodegradable polymers as carbon source for nitrate removal in marine re-circulated aquaculture systems. *Marine Sciences*, 2010, 34(6): 22–27 [谭洪新, 赖才胜, 罗国芝, 等. 以可生物降解聚合物为碳源去除海水闭合循环养殖系统中的硝酸盐. *海洋科学*, 2010, 34(6): 22–27]
- Tang CT, Luo GZ, Tan HX, *et al.* Effectiveness of nitrogen removal by simultaneous nitrification and denitrification reactor packed with poly (Butylene succinate) media. *Journal of Safety and Environment*, 2014, 14(5): 151–155 [唐成婷, 罗国芝, 谭洪新, 等. 以 PBS 为载体和碳源的 SND 系统的脱氮效果研究. *安全与环境学报*, 2014, 14(5): 151–155]
- Wang JL, Chu LB. Biological nitrate removal from water and wastewater by solid-phase denitrification process. *Biotechnology Advances*, 2016, 34(6): 1103–1112
- Wang W, Qu KM, Zhu JX, *et al.* Effect of carbon sources on bio-film cultivation and its nitrification-denitrification performance. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2013, 19(3): 495–500 [王威, 曲克明, 朱建新, 等. 不同碳源对陶环滤料生物挂膜及同步硝化反硝化效果的影响. *应用与环境生物学报*, 2013, 19(3): 495–500]
- Xin MX, Zhao Y, Zhou J, *et al.* The application of denitrifying bacteria in denitrification of wastewater. *Microbiology*, 2007, 34(4): 773–776 [辛明秀, 赵颖, 周军, 等. 反硝化细菌在污水脱氮中的作用. *微生物学通报*, 2007, 34(4): 773–776]
- Xu Y, Qiu TL, Han ML, *et al.* Heterotrophic denitrification of nitrate-contaminated water using different solid carbon sources. *Procedia Environmental Sciences*, 2011, 10: 72–77
- Xu ZS, Song LY, Dai XH, *et al.* PHBV polymer supported denitrification system efficiently treated high nitrate concentration

- wastewater: Denitrification performance, microbial community structure evolution and key denitrifying bacteria. *Chemosphere*, 2018a, 197: 96–104
- Xu ZS, Dai XH, Chai XL. Effect of different carbon sources on denitrification performance, microbial community structure and denitrification genes. *Science of the Total Environment*, 2018b, 634: 195–204
- Zhou ZM, Li H, Liu QS, *et al.* Current situation of the research on biological media in recirculating aquaculture system. *Technology of Water Treatment*, 2015, 41(12): 33–37 [周子明, 李华, 刘青松, 等. 工厂化循环水养殖系统中生物填料的研究现状. *水处理技术*, 2015, 41(12): 33–37]

(编辑 陈严)

The Impact of Hydraulic Retention Time on an Anaerobic Reactor's Nitrogen Removal Effect

WANG Zhenlin^{1,2}, ZHU Jianxin^{2①}, QU Keming², CHEN Shibo³

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Qingdao Excellence Ocean Group Co., Ltd., Qingdao 266408)

Abstract At present, domestic research on anaerobic denitrification is mostly at the laboratory stage. In order to develop highly efficient and suitable denitrification equipment for production, this study uses a self-designed anaerobic reactor with clinoptilolite as the filler, and naturally cultivated biofilm. By connecting the reactor to the primary biofilter of RAS, we aim to preliminarily investigate the reactor's nitrogen removal effect under different hydraulic retention times (HRT), with a view to direct subsequent research. The results show that during the experiment, the reactor has a good removal effect on inorganic nitrogen (IN) and total nitrogen (TN). When the HRT is short ($HRT < 7.43$ h), ammonium (NH_4^+-N) is the main form of nitrogen removed from the reactor, whereas with longer HRT ($HRT \geq 7.43$ h), nitrogen is removed as nitrate ($NO_3^- - N$). When the HRT is 17.52 h, the reactor's nitrogen removal efficiency is the best, and the removal rate of $NO_3^- - N$ reaches 77.48%. As HRT continues to extend, the nitrogen removal efficiency decreases. The better the nitrogen removal effect, the greater the accumulation of nitrite (NO_2^-) and ammonium, with the former accumulating first. Thus, this study can provide reference for the development of anaerobic denitrification equipment.

Key words Anaerobic reactor; Nitrogen removal effect; Flow rate; Hydraulic retention time; Naturally cultivating biofilm

① Corresponding author: ZHU Jianxin, E-mail: zhujx@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180321001

http://www.yykxjz.cn/

乔延龙, 殷小亚, 肖广侠, 王立平. 悬浮物胁迫中国对虾幼体的急性毒性研究. 渔业科学进展, 2019, 40(3): 50-56
Qiao YL, Yin XY, Xiao GX. Acute toxicity effects of suspended solids stress on *Fenneropenaeus chinensis* larvae. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(3): 50-56

悬浮物胁迫中国对虾幼体的急性毒性研究*

乔延龙^{1,2①} 殷小亚³ 肖广侠⁴ 王立平⁵

(1. 天津大学环境科学与工程学院 天津 300072; 2. 天津市海洋咨询评估中心 天津 300457;
3. 天津渤海水产研究所 中国水产科学研究院渤海水产研究中心 天津 300457;
4. 山东省临沂市罗庄区水务局 临沂 276017; 5. 天津市水产局 天津 300202)

摘要 随着沿海经济的迅速发展和海洋资源的大规模开发, 海洋工程建设产生的悬浮物会对海洋生物生长发育产生影响。为研究悬浮物对中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)幼体的毒性效应, 采用室内模拟半静态方法, 研究了不同浓度悬浮物对中国对虾幼体的急性毒性效应。结果显示, 随着时间的延长, 高浓度的悬浮物可抑制中国对虾幼体的游泳能力, 中国对虾幼体死亡率呈现出明显的剂量效应关系, 悬浮物对中国对虾幼体 48 h 和 96 h 的半数致死浓度(48 h-LC₅₀ 和 96 h-LC₅₀) 分别为 452.21 mg/L 和 183.74 mg/L, 对应的安全浓度为 18.37 mg/L。镜检观察结果显示, 中国对虾幼体体表有底泥附着, 鳃内有大量的悬浮物颗粒物。该研究为深入研究悬浮物对海洋生物的毒性效应提供了理论依据。

关键词 悬浮物; 改良寇氏法; 中国对虾幼体; 急性毒性

中图分类号 S910 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)03-0050-07

在经济全球化的发展进程中, 海洋资源逐渐呈现出过度开发与利用的状态。随着围海造地为主的海洋开发强度加大, 海洋工程引起周边海域悬浮物浓度升高, 致使近岸海洋生态系统功能减退。围绕悬浮物对海洋生态产生的问题已成为国内外研究热点(包瑛瑛, 2015; 李晓静等, 2017; 崔磊等, 2017)。研究表明, 悬浮物对水体中生物的生理、行为、摄食、生长、繁殖等产生影响, 高浓度的悬浮物可使水体生物死亡, 从而影响生物种群组成和群落结构的稳定(李铁军等, 2017; 蔡丽萍等, 2011)。近岸海域是水生生物繁殖的重要场所, 研究发现, 水体环境质量和生物个体生长

和发育存在一定联系(刘广远等, 1998; 王广军等, 2007)。目前, 悬浮物对水生生物毒性效应研究, 主要集中于疏浚淤泥和滩涂悬浮物对游泳能力强的鱼类及生物成体的毒性效应(周勇等, 2010; 王云龙等, 1999; 陈永平等, 2015; 王娟娟等, 2016; 蔡萌等, 2007; 李广楼等, 2010; 李纯厚等, 1997), 而有关大规模围填海区域滩涂悬浮物对游泳能力较弱的生物幼体毒害作用关注较少。围填海区域滩涂是生物幼体肥栖息的场所, 海洋工程产生的悬浮物对生物幼体毒性将直接影响海洋生物群体补充数量, 因此, 开展此项研究对于渔业资源和海洋生态系统平衡具有重要

* 海洋公益性行业科研专项(201505027; 201505018)、2010 年度中央分成海域使用金支出项目(环保类)、天津市科技兴海项目(KJXH2012-32; KJXH2013-22)和广东省渔业生态环境重点实验室开放基金资助(GDKFL2012-10)共同资助 [This work was supported by the Public Science and Technology Research Funds Projects of Ocean (201505027; 201505018), the Specialized Fund for Sea Use of year 2011 (Environmental protection), the Marine Promotion Program from the Tianjin Oceanic Administration (KJXH2012-32; KJXH2013-22), and the Guangdong Provincial Key Laboratory of Fishery Ecology and Environment (GDKFL2012-10)].

① 通讯作者: 乔延龙, 高级工程师, E-mail: tjsmarine@163.com

收稿日期: 2018-03-21, 收修改稿日期: 2018-05-18

意义。

渤海湾是渤海西部的半封闭浅水海湾,近岸滩涂广阔,水下地势平缓,在季风、海流、波浪、潮汐等对悬浮物输移和分布的影响下,较细的沉积物颗粒易于再悬浮,同时,在黄河沉积物扩散的双重影响下,渤海湾西北部成为高悬浮物浓度区,水体表层和底层的悬浮物浓度有较大差异(周舟等, 2017; 曹祖德等, 1993; Jiang *et al*, 1997; 江文胜等, 2002; 崔廷伟等, 2009)。随着沿海海洋经济快速发展,滨海地区海洋开发较为活跃,海上吹填、疏浚等海洋工程日趋频繁,海洋海岸工程扰动沉积物再悬浮,致使近岸海域悬浮物浓度急剧增加。中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)是黄、渤海地区的主要经济虾类,幼体阶段营浮游生活,以滤食浮游生物为主,变态发育为仔虾后营底栖生活,以底栖生物为主要饵料。环渤海围填海区域开发压缩了生物的栖息空间,海洋工程搅动产生悬浮物破坏了生物的生存环境,致使中国对虾资源急剧衰退,为了探究海洋生物幼体与滩涂悬浮物之间的关系,以渤海湾主要渔业经济物种和资源修复关键种——中国对虾仔虾期幼体为研究对象,利用实验生态学方法,研究了悬浮物对中国对虾幼体的毒性作用,可为探讨中国对虾幼体生态适应性提供参考,并对进一步研究近岸水体环境基准和生态环境容量具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验用中国对虾幼体采自天津市滨海新区天津神育苗有限公司养殖场,幼体体长为0.8~1 cm。实验前,将中国对虾幼体放入8 L海水的整理箱中暂养2 d,暂养海水经48 h曝气处理,挑选体长为1 cm、大小均匀、活力较好的个体进行悬浮物毒性实验,实验开始后减少饵料投喂。实验水体为天津大神堂海域

经沉淀、砂滤的自然海水。经测定,盐度为 31 ± 1.0 , pH为 8.1 ± 0.1 ,水温为 $(22\pm 1)^\circ\text{C}$,24 h连续充气,每天换水1次,换水量为三分之一,每天早晚各投喂配合饲料1次。

实验用悬浮物泥样采自天津大神堂($117^\circ 55' 18''\text{E}$; $39^\circ 09' 01''\text{N}$)外海的表层底泥,经室内通风晾干,然后放在烘箱中(60°C)烘干至恒重,冷却,研磨后用200目筛绢过筛,置于干燥器中低温保存。泥样的主要指标(测定结果见表1)与国家标准进行比较,硫化物、重金属(Hg、Cu、Zn、Pb和Cd)和油类物质的检测值达到我国海洋沉积物质量标准(GB18668-2002)的一级标准。

1.2 实验方法

采用《水质物质对淡水鱼(斑马鱼)急性毒性测定方法(GB/T13267-1991)》。在实验开始前,进行急性毒性预实验,确定悬浮物浓度范围。根据预实验结果,本实验设置20、40、80、160、320、640 mg/L共6个悬浮物梯度,每个实验浓度设3组平行实验,同时设1个对照组,每组投放中国对虾幼体50尾。实验水温与暂养时保持一致,各组充气量相同,以气泡均匀、悬浮物不沉底为准。每天08:00换水,每隔2 h用玻璃棒进行搅拌,保持持续充气,使泥样始终处于悬浮状态。暴露后,每2 h观察1次中国对虾幼体的状态,连续8 h,之后每12 h观察1次,暴露48 h后,每24 h观察1次,统计各组中国对虾幼体的死亡情况,死亡标准为用细玻璃棒触动其腹部,5 s内没有任何反应,则视其为死亡,在显微镜下镜检观察、拍照。记录中国对虾幼体的死亡个数、死亡时间,统计死亡率,并将3个平行组的平均值作为每个浓度的实验结果。根据预实验结果,中国对虾幼体在悬浮物处理12 h后陆续出现中毒症状,实验周期设为12、24、48、72和96 h。

表1 悬浮物主要成分含量(mg/kg)
Tab.1 Main components of the suspended solids (mg/kg)

样品号 Sample No.	重金属 Heavy metals						石油类 Petroleum	硫化物 Sulfide	有机质 Organic matter(%)
	Cu	Zn	Pb	Cd	Hg	As			
1	22.30	66.30	18.70	0.04	0.028	4.45	20.50	0.139	1.90
2	22.70	66.10	18.70	0.05	0.023	4.65	22.40	0.144	1.72
3	23.50	66.20	18.90	0.05	0.026	4.53	21.80	0.135	1.85
平均值 Average	22.80	66.02	18.80	0.05	0.026	4.54	21.60	0.139	1.83
标准差 SD	0.60	0.10	0.10	0.01	0.003	0.10	0.97	0.005	0.09
一类标准 First Standard*	35	150	60	0.50	0.20	20	500	300	2.00

*为《海洋沉积物质量》(GB 18668-2002)标准第一类(国家技术监督局, 2002)

*Marine sediment quality, (GB 18668-2002) First Standard (State Bureau of Technology Supervision, 2002)

1.3 镜检观察

将取出的中国对虾幼体死亡个体进行去脱水处理后,置于光学显微镜下观察,经连接相机(Olympus SZX7)进行拍照。

1.4 数据处理

实验中所有数据均采用改良寇式法进行统计分析(黄瑞等, 2017; 孙瑞元, 1963), 计算各实验悬浮物浓度组对中国对虾幼体的半致死浓度 LC_{50} 和 LC_{50} 时的 95% 置信区间, 计算公式如下:

$$LC_{50} = \log^{-1} \left[X_m - i \left(\sum p - 0.5 \right) \right]$$

$$S_{x50} = i \sqrt{\sum \frac{pq}{n}}$$

$$LC_{50} (95\%) = \log^{-1} (\log LC_{50} \pm 1.96 \times S_{x50})$$

式中, i 为组距, 即相邻 2 组对数剂量之差; X_m 为最大剂量对数; p 为各剂量组死亡率(死亡率均用小数表示); q 为各剂量组存活率(存活率均用小数表示); $\sum p$ 为各剂量组死亡率之和; n 为各组实验动物数; S_{x50} 为 $\log LC_{50}$ 的标准误。

安全浓度公式:

$$SC = 0.1 \times 96hLC_{50}$$

2 结果与分析

2.1 中国对虾幼体的中毒症状

在放入悬浮液中的前几小时, 中国对虾幼体比较活跃, 上下游动, 游动速度较快。但随着受试时间的增加, 游动速度逐渐变缓, 最后潜伏于实验容器下部, 静止不动。随实验时间增加, 受试中国对虾幼体逐渐昏迷, 直至死去。在此实验过程中, 实验中国对虾幼体体色也发生了变化, 由最初健康的青色, 逐渐蜕变为粉色, 继而变为灰白色。

2.2 中国对虾幼体死亡率

在急性毒性实验中, 随着暴露时间延长, 中国对虾幼体死亡个体数量呈现增加趋势(表 1)。暴露 12 h 时, 20~80 mg/L 组中国对虾幼体没有出现死亡, 160~640 mg/L 组开始出现死亡情况; 暴露 24 h 时, 20~40 mg/L 组没有死亡个体, 80 mg/L 组开始出现死亡; 暴露 36 h 时, 20~40 mg/L 组开始出现死亡个体; 48~96 h 时, 随着悬浮物浓度增加, 中国对虾幼体的死亡率逐渐增加, 并呈现出明显的剂量效应关系。

在不同浓度悬浮物实验组, 随着时间推移, 中国对虾幼体出现死亡个体时间节点呈现延后现象。实验

对照组在 12~36 h 内未发现死亡个体, 在 72 h 时出现死亡个体。实验浓度为 20、40 mg/L 时, 在 12~24 h 内未发现死亡个体, 在 48 h 出现死亡个体; 实验浓度为 80 mg/L 时, 在 12 h 内未发现死亡个体, 在 24 h 出现死亡个体; 实验浓度为 320 mg/L 和 640 mg/L, 12 h 就出现死亡个体; 640 mg/L 在 60 h 时的死亡率达到 64%。

表 2 中国对虾幼体悬浮物急性毒性实验结果
Tab.2 Results of acute toxicity experiment of *Fenneropenaeus chinensis* larve

悬浮物浓度 Concentration of suspended solids (mg/L)	幼体个数 No. of larve (ind.)	死亡率 Mortality (%)					
		12 h	24 h	36 h	48 h	72 h	96 h
0	50	0	0	0	0	5	10
20	50	0	0	2	5	21	29
40	50	0	0	4	9	22	37
80	50	0	2	5	13	28	31
160	50	2	5	8	14	29	37
320	50	2	8	12	18	30	34
640	50	18	30	40	42	80	90

2.3 急性毒性实验结果

在悬浮物条件下胁迫 12 h 后, 中国对虾幼体的死亡率开始增加, 随着暴露时间延长, 累积死亡率快速增加, 悬浮浓度达到 640 mg/L 以上, 中国对虾幼体累积死亡率超过 50%, 同时, 20、40、80、160、320 mg/L 的累积死亡率分别为 13%、19%、20%、21%、22%, 而对照组的累积死亡率仅有 4% (图 1)。

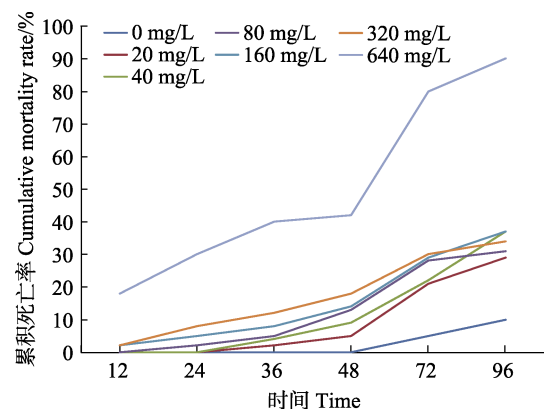


图 1 悬浮物对中国对虾幼体的累积死亡率
Fig 1 Cumulative mortality rate of *Fenneropenaeus chinensis* larve under the suspended solids

经计算得到悬浮物对中国对虾幼体 12、24、36、48、72、96 h 的 LC_{50} 和 LC_{50} 的 95% 置信区间, 96 h- LC_{50} 安全浓度为 1.83 mg/L (表 3)。

表3 悬浮物对中国对虾的急性毒理实验
Tab.3 Acute toxicity of suspended solids to *Fenneropenaeus chinensis* larve

实验时间 Experimental time (h)	LC ₅₀ (mg/L)	95%置信区间 95% confidence interval	安全浓度 Safe concentration (mg/L)
12	787.97	856.21±725.17	
24	640.00	717.14±571.16	
36	554.60	637.44±482.53	
48	452.51	534.70±382.96	18.37
72	211.07	258.56±172.30	
96	183.74	223.66±150.94	

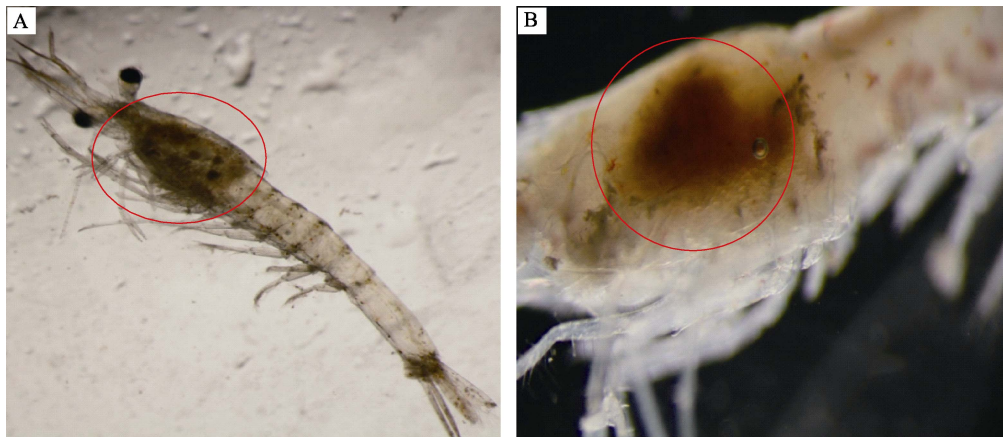


图2 悬浮物对中国对虾幼体的中毒症状
Fig.2 Symptoms of *Fenneropenaeus chinensis* larve under the suspended solids

A: 整虾; B: 鳃部
A: Whole shrimp; B: Gill

2.4 急性毒性实验镜检

采用解剖镜对中国对虾死亡幼体鳃和体表进行观察。从镜检情况来看,死亡个体体表附着一层薄薄底泥,死亡对虾个体的鳃内存在颗粒物,解剖镜观察下为底泥颗粒。

3 讨论

水生生物对环境质量的变化有一定耐受性,但对摄食、运动、生理生化等功能将产生影响(沈建忠, 2004; 钟硕良等, 2017; 冯政夫等, 2016)。本研究结果表明,中国对虾幼体在悬浮物胁迫下出现急性毒性效应,随着悬浮物暴露时间的延长和悬浮物浓度的升高,实验组中国对虾幼体的死亡率不断上升,当悬浮物溶度低于 320 mg/L 时,中国对虾幼体死亡率较稳定,剂量效应不明显,悬浮物浓度高于 640 mg/L 时,中国对虾幼体死亡个体增加,呈现明显的剂量效应,出现悬浮物对中国对虾幼体致死效应。由于悬浮物的

主要有害物质低于《海洋沉积物质量》一类要求,实验海水各项水质指标的含量均符合《海水水质标准》二类要求,不会对实验动物产生毒害作用,造成中国幼体死亡。通过镜检,中国对虾幼体鳃部有大量悬浮物颗粒,可能由于中国对虾幼体呼吸作用下,悬浮物中的微小颗粒随水流到达鳃的表面,吸附在鳃丝表面,造成生物体呼吸障碍,致使生物体出现死亡。同时,随着中国对虾幼体中毒程度加深,悬浮物颗粒粘附在个体的体表和附肢上,减弱了游泳能力(McLeay *et al*, 1987),致使摄食行为受到影响,加剧中国对虾幼体死亡。

将本研究悬浮物对中国对虾幼体的 LC₅₀ 与已报道悬浮物对其他水生生物的 LC₅₀ 进行比较(表 4),可以得出,近岸海域悬浮物毒性大小排序为,鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)幼体>梭鱼(*Sphyraenus*)幼体>半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)幼体>中国对虾幼体。基于生物生态位分析,中国对虾是一种广温广盐底层甲壳类,半滑舌鳎是一种广温广盐底层鱼类,

表 4 悬浮物对几种水生生物的急性毒性
Tab.4 Acute toxicity of suspended solids to several aquatic species

实验动物 Test species	悬浮物 Suspended solids			参考文献 References
	来源 Source	72h-LC ₅₀ (mg/L)	96h-LC ₅₀ (mg/L)	
中国对虾幼体 <i>F. chinensis</i> larvae	疏浚淤泥(天津近岸)	226.5	52.4	李广楼等(2010)
中国对虾幼体 <i>F. chinensis</i> larvae	滩涂底泥(天津近岸)	211.1	183.7	本研究
半滑舌鳎幼体 <i>Cynoglossus semilaevis</i> Gunther larvae	滩涂底泥(山东海阳)	/	202.9	周勇(2000)
梭鱼幼鱼 <i>Sphyaenus</i> larvae	疏浚淤泥(天津近岸)	794.3	168.1	王娟娟等(2016)
鲈鱼幼鱼 <i>Lateolabrax japonicus</i> larvae	疏浚淤泥(天津近岸)	2722.8	1052.8	王娟娟等(2016)

鲈鱼和梭鱼是一种广温广盐中上层鱼类。通过对比发现,生态位较高的水生生物游泳能力强,对悬浮物的耐受性强,能及时产生回避反应,迁移至安全水域。Henley等(2000)研究发现,悬浮物较多的浑浊水体,迫使浮游生物和鱼类同时发生迁移活动。由此可见,悬浮物对迁移能力弱的水生生物幼体、胚胎等具有较强的急性毒性。通过与王娟娟等(2016)研究对比发现,滩涂底泥悬浮物对中国对虾幼体的 LC₅₀ 小于疏浚悬浮物,原因可能是受双向的沿岸环流影响,本研究所取渤海湾西部天津海域滩涂底泥表层以砂、粉砂质砂、砂纸粉砂和粘土质粉砂 4 种沉积物为主,而在天津港航道取样的疏浚悬浮物颗粒直径小于滩涂底泥,更容易堵塞生物幼体鳃腔,同时,疏浚物悬浮物可溶出硝基苯类、DMS、卤代酚类等有机物和重金属物质(季晓等, 2013),在疏浚淤泥的悬浮物和溶出化学污染物联合作用下,随着时间延长,可能致使疏浚悬浮物产生较强的毒性,且致毒机理也可能不同。

随着渤海湾沿海海洋经济快速发展,在过度捕捞、海洋环境污染、海洋海岸工程等影响下,天津海洋生物资源呈现急剧衰退趋势,渔业生物群体小型化、低龄化,渔获种类组成低质化、低值化现象日趋严重。为了养护近岸海洋生物资源,利用海洋海岸工程生态补偿资金,近几年,在海岸生态环境受损区域开展了生物增殖放流,以期恢复近岸生物资源。但是,在水生生物苗种增殖放流选址方面,主要依据温度、盐度等常规水环境指标,为了提高放流苗种成活率,需综合考虑放流区域悬浮物浓度变化情况,优化水生生物苗种增殖放流地点。同时,渤海湾作为海洋生物资源的三场一通道,对黄海、渤海渔业资源和生态环境意义重大,在每年 5~6 月海洋渔业生物产卵期,建议海洋和渔业行政主管部门限制近岸海域清淤和围填海工程审批,严格控制海洋海岸工程扰动强度,降低近岸海域悬浮物浓度,减少对海洋渔业生物幼体伤害。该研究结果可为渤海及其他海区近岸滩涂海洋生物资源恢复和养护管理提供参考依据。

参 考 文 献

- Bao YY. Study on the impact assessment method of reclamation activities on marine resources. *Resources Economization & Environment Protection*, 2015(2): 81 [包瑛瑛. 研究围填海开发活动对海洋资源影响评价方法. *资源节约与环保*, 2015(2): 81]
- Bian XD, Wan RJ, Jin XS, *et al.* Ichthyoplankton succession and assemblage structure in the Bohai Sea during the past 30 years since the 1980s. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(2): 1-19 [卞晓东, 万瑞景, 金显仕, 等. 近 30 年渤海鱼类种群早期补充群体群聚特性和结构更替. *渔业科学进展*, 2018, 39(2): 1-19]
- Cai LP, Jin JL, Hu YF, *et al.* Investigation of the present situation and discussion of the protection measures about the reclamation in Zhoushan. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2011, 30(6): 552-555 [蔡丽萍, 金敬林, 胡益峰, 等. 舟山围填海现状调查与保护措施探讨. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2011, 30(6): 552-555]
- Cai M, Shen AL, Xu ZL, *et al.* The toxic effect of the dredged mattials on the halobios. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(B10): 519-523 [蔡萌, 沈盎绿, 徐兆礼, 等. 疏浚物海洋倾倒对海洋生物的毒害效应. *农业环境科学学报*, 2007, 26(B10): 519-523]
- Cao ZD, Wang GF. Numerical simulation of flow and sediment transport. *Acta Oceanologica Sinica*, 1993, 15(1): 107-118 [曹祖德, 王桂芬. 波浪掀沙、潮流输沙的数值模拟. *海洋学报*, 1993, 15(1): 107-118]
- Chen YP, Wang JJ, Li ZQ, *et al.* Influence of the suspended substances on marine organisms in the port Tianjin. *Hebei Fisheries*, 2015(1): 8-12 [陈永平, 王娟娟, 李兆千, 等. 天津港口疏浚淤泥悬浮物对海洋动物的急性毒性效应. *河北渔业*, 2015(1): 8-12]
- Cui L, Lü SH, Dong YL, *et al.* Influence on the biological community and environmental factors around Qi'ao Island caused by reclamation project. *Journal of Tropical Oceanography*, 2017, 36(2): 96-105 [崔磊, 吕颂辉, 董悦镭, 等. 围填海工程对淇澳岛附近水域环境因子与生物群落的影响. *热带海洋学报*, 2017, 36(2): 96-105]

- Cui YW, Zhang J, Ma Y, *et al.* The study on the distribution of suspended particulate matter in the Bohai Sea by remote sensing. *Acta Oceanologica Sinica*, 2009, 31(5): 10–18 [崔廷伟, 张杰, 马毅, 等. 渤海悬浮物分布的遥感研究. *海洋学报*, 2009, 31(5): 10–18]
- Feng ZF, Lin XF, Ge LL, *et al.* Differentiation and development of external sex characteristics of shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(6): 68–73 [冯政夫, 林晓菲, 葛蕾蕾, 等. 中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 外部性征的分化及发育. *渔业科学进展*, 2016, 37(6): 68–73]
- Henley WF, Patterson MA, Neves RJ, *et al.* Effects of sedimentation and turbidity on lotic food webs: A concise review for natural resource managers. *Fisheries Science*, 2000, 8(2): 125–139
- Huang R, Xu FK. Study on the acute toxicity of rotenone to *Lateolabrax japonicus* and *Chaeturichthys stigmatias* Richardson. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2017(1): 96–101 [黄瑞, 徐丰恺. 鱼藤酮对花鲈、矛尾虾虎鱼的急性毒性研究. *海洋湖沼通报*, 2017(1): 96–101]
- Ji X, Xu R, Liu Y, *et al.* Effects of clean dredging materials bury on *Ruditapes philippinaru*. *Marine Science Bulletin*, 2013, 32(6): 704–709 [季晓, 徐韧, 刘玉, 等. 清洁疏浚物掩埋对菲律宾蛤仔成体的存活影响. *海洋通报*, 2013, 32(6): 704–709]
- Jiang W, Mayer B. A study on the transportation of suspended particulate matter from Yellow River by using a 3D particle model. *Periodical of Ocean University of Qingdao*, 1997, 27(4): 439–445
- Jiang WS, Su J, Yang H, *et al.* The relationship between SPM concentration and hydrodynamic condition in the Bohai Sea. *Acta Oceanologica Sinica*, 2002(Z1): 212–217 [江文胜, 苏健, 杨华, 等. 渤海悬浮物浓度分布和水动力特征的关系. *海洋学报*, 2002(Z1): 212–217]
- Li CH, Lin YT, Yang ML, *et al.* The acute toxicity of the sludge suspended solution from a port of South China Sea to marine animals. *China Environmental Science*, 1997, 17(6): 71–74 [李纯厚, 林燕棠, 杨美兰, 等. 南海海港疏浚淤泥悬浮物对海洋动物的急性毒性效应. *中国环境科学*, 1997, 17(6): 71–74]
- Li GL, Zhang GY, Mao TY, *et al.* Study on the influence of the suspended dredging sediment on two kinds of marine organisms from the Port. *Shandong Fisheries*, 2010, 27(2): 1–4 [李广楼, 张光玉, 毛天宇, 等. 港口疏浚淤泥悬浮物对2种海洋生物的急性毒性试验研究. *齐鲁渔业*, 2010, 27(2): 1–4]
- Li TJ, Xu D, Xu HX, *et al.* Influence analysis of coastal reclamation on fishery resource and marine ecological environment in Zhejiang Province. *Modern Agricultural Sciences and Technology*, 2017(18): 213–214 [李铁军, 徐丹, 徐汉祥, 等. 浙江省围填海工程对海洋生态环境和渔业资源的影响分析. *现代农业科技*, 2017(18): 213–214]
- Li XJ, Zhou ZQ, Chen LL, *et al.* Effect of coastal reclamation on benthic macrofauna in coastal area of Caofeidian, Bohai Bay. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2017, 48(3): 617–627 [李晓静, 周政权, 陈琳琳, 等. 渤海湾曹妃甸围填海工程对大型底栖动物群落的影响. *海洋与湖沼*, 2017, 48(3): 617–627]
- Liu GY, He W, Shao MH, *et al.* Study on the dredged matter lead to acute lethality for *Chlamys fazzeri* in the laboratory. *Marine Environmental Science*, 1998, 17(3): 19–23 [刘广远, 贺伟, 邵秘华, 等. 疏浚物对栉孔扇贝急性致死量的实验研究. *海洋环境科学*, 1998, 17(3): 19–23]
- McLeay DJ, Birtwell IK, Hartman GF, *et al.* Responses of Arctic grayling (*Thymallus arcticus*) to acute and prolonged exposure to yukon placer mining sediment. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 1987, 44(3): 658–673
- Shen JZ. *Animal toxicology*. Beijing: China Agriculture Press, 2004, 83–87 [沈建忠. *动物毒理学*. 北京: 中国农业出版社, 2004, 83–87]
- Sun RY. A practical combined method for computing the median lethal dose (LD₅₀). *Acta Pharmaceutica Sinica*, 1963, 10(2): 65–74 [孙瑞元. 简捷实用的半数致死量综合计算法. *药理学学报*, 1963, 10(2): 65–74]
- Wang GJ, Xie J, Yu DG, *et al.* Physiological responses of abalone *Haliotis divericolor* to suspended sediment stress. *Journal of Dalian Ocean University*, 2007, 22(5): 352–356 [王广军, 谢骏, 余德光, 等. 杂色鲍对底泥悬浮物胁迫的生理响应. *大连水产学院学报*, 2007, 22(5): 352–356]
- Wang JJ, Jiao JH, Ma D, *et al.* Acute toxic effects of reclaimed silt and suspended solids on marine organism resources in Tianjin. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(2): 16–24 [王娟娟, 缴建华, 马丹, 等. 围填海吹填淤泥及悬浮物对天津海域海洋生物资源的急性毒性效应. *渔业科学进展*, 2016, 37(2): 16–24]
- Wang YL, Cheng YX, Xu ZL, *et al.* Effects of suspended dredging sediment and its dissolved Zn²⁺ on the spawn and early development of Chinese crab *Eriocheir sinensis* in the Changjiang estuary. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1999, 6(5): 24–28 [王云龙, 成永旭, 徐兆礼, 等. 长江口疏浚土悬浮物及其溶出 Zn²⁺ 对中华绒螯蟹产卵率和早期发育的影响. *中国水产科学*, 1999, 6(5): 24–28]
- Zhang Y, Zheng B, Xie HB, *et al.* Acute toxicological effects of suspended solids on larvae of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Fisheries Science*, 2017, 36(1): 42–47 [张艳, 郑琳, 谢寒冰, 等. 悬浮物对中国明对虾幼体急性毒性效应研究. *水产科学*, 2017, 36(1): 42–47]
- Zhong SL, Zheng HD, Chen YF, *et al.* The acute toxicity and bioaccumulation of deltamethrin in four species of mariculture organisms. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(6): 139–147 [钟硕良, 郑惠东, 陈宇锋, 等. 溴氰菊酯对4种海水养殖生物的毒性及其积累. *渔业科学进展*, 2017, 38(6): 139–147]

- Zhou Y, Ma SS, Qu KM, *et al.* Acute toxic effects of suspended substances on juvenile of *Cynoglossus semilaevis* Gunther. *Marine Environmental Science*, 2010, 29(2): 229–232 [周勇, 马绍赛, 曲克明, 等. 悬浮物对半滑舌鲷稚鱼的急性毒性效应. *海洋环境科学*, 2010, 29(2): 229–232]
- Zhou Y, Ma SS, Qu KM, *et al.* Toxic effects of suspended substances (SS) on the embryos and newly-hatched larvae of *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(3): 32–37 [周勇, 马绍赛, 曲克明, 等. 悬浮物对半滑舌鲷胚胎和初孵仔鱼的毒性效应. *渔业科学进展*, 2009, 30(3): 32–37]
- Zhou Z, Zhang WL, Jiang WS, *et al.* Long-term variation of suspended sediment concentration in the Bohai Sea based on retrieved satellite data. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2017, 47(3): 10–18 [周舟, 张万磊, 江文胜, 等. 渤海表层悬浮物浓度长期变化(2003–2014年)的卫星反演研究. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2017, 47(3): 10–18]

(编辑 冯小花)

Acute Toxicity Effects of Suspended Solids Stress on *Fenneropenaeus chinensis* Larvae

QIAO Yanlong^{1,2①}, YIN Xiaoya³, XIAO Guangxia⁴, WANG Liping⁵

(1. College of Science & Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072; 2. Tianjin Marine Research and Consulting Centre, Tianjin 300457; 3. Tianjin Bohai Sea Fisheries Research Institute, Bohai Sea Fisheries Research Center of Chinese Academy of Fishery Sciences, Tianjin 300457; 4. Water Bureau of Luozhuang District of Linyi City, Shandong Province, Linyi 276017; 5. Bureau of Aquatic Products, Tianjin 300202)

Abstract With the development of marine resources in coastal areas, marine engineering affects the growth and development of marine animals. Acute toxicity of suspended solids with different concentrations on *Fenneropenaeus chinensis* larvae was evaluated by the semi-static method. The results showed that high concentrations of suspended solids inhibited the swimming ability of *Fenneropenaeus chinensis* larvae. The 48 h-LC₅₀ and 96 h-LC₅₀ values of suspended solids to suspension was 452.21 mg/L and 183.7 mg/L, respectively, and the safe concentration was 18.37 mg/L. The microscopic examination showed that the *Fenneropenaeus chinensis* larvae body surface sediment had a large quantity of suspended particulate matter in the gills. This study provides a theoretical foundation for an understanding of the toxic effects of suspended solids on marine animals.

Key words Suspended solids; Karber's method; *Fenneropenaeus chinensis* larvae; Acute toxicity

① Corresponding author: QIAO Yanlong, E-mail: tjsmarine@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20181129001

http://www.yykxjz.cn/

侯吉伦, 郭亚男, 付元帅, 王桂兴, 张晓彦, 孙朝徽, 司飞, 王玉芬. 牙鲆 *efhd2* 和 *tbc1d25* 基因的克隆和表达分析. 渔业科学进展, 2019, 40(3): 57-68

Hou JL, Guo YN, Fu YS, Wang GX, Zhang XY, Sun ZH, Si F, Wang YF. Cloning and expression analysis of *efhd2* and *tbc1d25* gene in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(3): 57-68

牙鲆 *efhd2* 和 *tbc1d25* 基因的克隆和表达分析*

侯吉伦¹ 郭亚男² 付元帅² 王桂兴¹
张晓彦¹ 孙朝徽¹ 司飞¹ 王玉芬¹①



(1. 中国水产科学研究院北戴河中心实验站 秦皇岛 066100;

2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 为在分子水平解析牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)抗淋巴囊肿病的机理,本研究克隆牙鲆淋巴囊肿抗病免疫相关基因 *efhd2* 和 *tbc1d25* 的 cDNA 全序列,运用生物信息学方法对基因序列进行了详细分析;同时,采用荧光定量 PCR 分析了 *efhd2* 和 *tbc1d25* 基因在牙鲆胚胎发育不同阶段、淋巴囊肿抗病和患病个体不同组织的表达特征。结果显示, *efhd2* 基因 cDNA 全长为 5231 bp, 开放阅读框(ORF)长为 699 bp, 编码 232 个氨基酸。 *tbc1d25* 基因 cDNA 全长为 3173 bp, ORF 长为 2601 bp, 编码 866 个氨基酸。定量结果显示, *efhd2* 和 *tbc1d25* 基因在胚胎发育的各个时期均有不同程度的表达,其中, *efhd2* 在出膜仔鱼期表达量最高,而 *tbc1d25* 在受精卵中的表达量显著高于其他时期 ($P<0.05$)。在所研究的淋巴囊肿抗病和患病个体不同组织中, *efhd2* 和 *tbc1d25* 基因均有不同程度的表达,抗病个体的血液中,这 2 个基因的表达量均显著高于患病个体 ($P<0.05$)。本研究结果为深入探讨 *efhd2* 和 *tbc1d25* 基因功能和解析牙鲆淋巴囊肿抗病机理提供了基础资料。

关键词 淋巴囊肿; 抗病机理; 血液; 胚胎发育

中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2019)03-0057-12

水产品是人类优质动物蛋白的重要来源。我国是世界上最大的水产动物养殖国,产量已连续多年位居世界首位。在多年的高速发展过程中,制约养殖产业健康可持续发展的不利因素逐渐显现出来,对水产养殖业的产量和效益造成严重影响。在众多传染性病害中,病毒性疾病所造成的影响尤为严重。隶属于虹彩病毒科(Iridoviridae)的淋巴囊肿病毒为重要病原之一,该病毒粒子正面观为六角形的正二十面体构造,因所依赖的宿主细胞不同,病毒粒子大小有差异,直径介于 130~350 nm 之间,由核心体、中间脂质层和

衣壳三部分组成(Paperna *et al.*, 2001; Anders, 1989)。目前,淋巴囊肿病毒呈世界性分布,造成 9 目 42 科 125 种以上鱼类感染此病,其中,海水鱼占 30 科(Wolf, 1988)。病鱼在身体躯干、口等部位可见不同形状的囊肿物,虽致死率不高,但使患病鱼失去商品价值(侯吉伦等, 2017)。

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)为底栖冷水性鱼类,具有生长迅速、肉质鲜美、营养价值高、适宜集约化工厂养殖等特点,已成为我国北方的主要海水鱼类增养殖品种之一(司飞等, 2017)。1997 年,我国养殖的

* 中国水产科学研究院基本科研业务费(2016HY-ZD0202)和现代农业产业技术体系专项资金(CARS-47)共同资助 [This work was supported by Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Chinese Academy of Fishery Sciences (2016HY-ZD0202), and China Agriculture Research System (CARS-47)]. 侯吉伦, E-mail: jilunhou@126.com

① 通讯作者: 王玉芬, 高级工程师, E-mail: wangyf-8000@163.com

收稿日期: 2018-11-29, 收修改稿日期: 2018-12-24

牙鲆首次出现淋巴囊肿病,并逐渐成为危害牙鲆养殖业的重要疾病之一。针对牙鲆淋巴囊肿病,国内外学者开展了大量的研究,并取得了相应的研究进展(Fuji *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2010; Hwang *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015、2018)。为了在我国选育牙鲆抗淋巴囊肿新品种以及在分子层面解析抗病机理,作者在前期利用高通量测序技术对淋巴囊肿抗病和患病牙鲆头肾组织进行了转录组分析,筛选获得了包括 *efhd2* 和 *tbc1d25* 在内的一批和抗病性紧密相关的功能基因。

EF-hand 蛋白结构域 D2(EF-hand domain-containing protein D2, EFHD2), 又称为 Swi-prosin-1, 是一个高度保守的钙结合蛋白,属于 EF-hand 结构域家族,位于细胞膜脂筏微区域(Vuadens *et al.*, 2004)。EFHD2 在其 C-端有 1 个保守的卷曲螺旋结构域,为蛋白质-蛋白质相互作用所必需的;在 N-末端,则具有独特的多聚丙氨酸基序(大小为 6~9 个丙氨酸)。EFHD2 广泛表达于包括 B 细胞、CD4+/CD8+T 细胞、自然杀伤细胞和外周血单个核细胞等各类细胞,在免疫调控起到重要的调控作用(Vega, 2016)。EFHD2 可通过调节适应性和先天性免疫受体信号的关键因子 Src 激酶的活性而参与免疫细胞活化(Kroczyk *et al.*, 2010);调节未成熟 B 细胞的寿命和 BCR 信号阈值;同时,作为 NF-kappa-B 信号通路的负调节因子,通过 *bcl2l1* 丰度的调节实现自发性凋亡的调控(Avramidou *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2013)。

TBC1D25(TBC1 domain family member 25), 又称为 OATL1, 属于 TBC 家族,含有一段长约 200 个氨基酸的保守 TBC(Rab-GAP)结构域。TBC 结构域蛋白通过特异性识别 Rab 小 GTP 酶参与到细胞信号传导、肿瘤形成及细胞内其他的活动(Fukuda, 2011)。TBC1D25 被鉴定为一种新的 Atg8 同源结合蛋白,通过与 Atg8 同系物直接相互作用被招募至自噬体(Itoh *et al.*, 2011)。同时,作为 Rab33B(一种结合 Atg16L1 的 Rab 蛋白)的 GTP 酶激活蛋白过表达促进 GTP 酶 RAB33B 从 GTP 结合蛋白向 GDP 结合蛋白的平衡,进而调节自噬体和溶酶体之间的融合来延迟自噬体的成熟,从而实现抑制自噬的作用(Itoh *et al.*, 2017; Corona *et al.*, 2018)。

鉴于 *efhd2* 和 *tbc1d25* 在免疫调控中的重要作用,本研究首先利用 RACE 法(Rapid-amplification of cDNA ends)克隆了牙鲆 *efhd2* 和 *tbc1d25* 的 cDNA 全序列,并对序列特征进行了生物信息学分析,同时,通过荧光定量 PCR 技术,研究了它们在牙鲆淋巴囊肿抗病和患病个体各组织、胚胎发育不同阶段的表达

特征,以期阐明 *efhd2* 和 *tbc1d25* 在牙鲆抗淋巴囊肿病中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

牙鲆淋巴囊肿抗病和患病个体取自中国水产科学研究院北戴河中心实验站昌黎养殖基地,体重为(235.65±73.18) g,全长为(30.49±3.17) cm。选取体表无淋巴囊肿瘤状物的 3 尾抗病牙鲆和有淋巴囊肿瘤状物的 3 尾患病牙鲆(侯吉伦等, 2017),分别取全血、鳃、肝脏、头肾、肠、性腺、肌肉、心脏和脾脏等置于液氮中速冻,48 h 后置于-80℃保存备用。实验所用牙鲆不同发育时期胚胎的按照刘海金等(2008)的方法进行制备,受精卵在(16.0±0.5)℃的海水中孵化,采集受精卵(受精后 0 h,下同)、4 细胞(2 h)、32 细胞(4 h)、128 细胞(5 h)、高囊胚(6 h)、低囊胚(11 h)、原肠早期(15 h)、原肠晚期(27 h)、肌节期(32 h)、心跳期(55 h)和出膜仔鱼(62 h)样品,于液氮中速冻,48 h 后置于-80℃保存备用。

1.2 RNA 提取及 cDNA 合成

采用 Trizol 法对本研究所需各样本的总 RNA 进行提取,琼脂糖凝胶电泳检测所提取总 RNA 质量,微量紫外分光光度计(Pultron P100+)测定 RNA 浓度。经检测合格后的 RNA,用 cDNA 试剂盒(Thermo K1621)反转录获得 cDNA 模板。

1.3 基因全长序列的克隆

根据牙鲆全基因组(Shao *et al.*, 2017; Wei *et al.*, 2017)和 GenBank 数据库中登记的牙鲆 *efhd2*(XM_020089176.1)和 *tbc1d25*(XM_020089412.1)基因序列,利用 Primer Premier 6.0 设计引物(*efhd2*-F/*efhd2*-R, *tbc1d25*-F/*tbc1d25*-R, 表 1),以头肾 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,验证核心片段的准确性。PCR 反应体系:上下游引物各 0.6 μl,模板 cDNA 1 μl,PCR Mix 7.5 μl,加 ddH₂O 至 15 μl。PCR 反应程序为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,为 35 个循环;72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳、回收纯化,克隆至 pMD18-T 载体,转化至 Top10 感受态细胞,取 3 个阳性克隆进行测序。

在此基础上,利用 Primer Premier 6.0 分别设计 5' 和 3' 端的接头引物和特异性引物(表 1),并采用 RACE 法,以牙鲆淋巴囊肿抗病个体头肾 RNA 为模板,进行降落 PCR 和巢式 PCR。PCR 产物经纯化、克隆、测序等步骤,获得 5' 和 3' 端序列。利用 SnapGene

4.1 软件, 对所获得的 5'和 3'RACE 序列以及中间片段进行拼接, 获得 *efhd2* 和 *tbc1d25* 的 cDNA 全长序列。

1.4 基因的生物信息学分析

氨基酸序列用 ExPASy (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>) 进行分析; 蛋白质结构预测使用 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de>); 信号肽使用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行寻找; 用 TMHMM server v.2.0 分析氨基酸跨膜区(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>); 采用 ClustalX2 对氨基酸序列进行多重比对。使用 MEGA10.0 软件的 Neighbor-Joining(NJ)法构建系统进化树(Bootstrap=1000)。

1.5 荧光定量 PCR

根据牙鲈 *efhd2*、*tbc1d25* 和 β -actin(内参基因)基因序列, 分别设计目的基因和内参的引物(表 1), 并以淋巴囊肿抗病和患病个体不同组织以及胚胎发育

不同时期的 cDNA 为模板, 进行荧光定量 PCR 检测。定量检测采用 Power SYBR Green PCR Master Mix (ABI, 美国)试剂盒在 ABI 7900 PCR 仪上开展。基因的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析(马慧鑫等, 2018)。所有样品均设置 3 个平行, 结果以平均值 \pm 标准误 (Mean \pm SE)表示, 并利用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA) ($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 牙鲈 *efhd2* 与 *tbc1d25* 基因序列分析

本研究克隆到的牙鲈 *efhd2* 基因 cDNA 全长 5231 bp, 其中, 5'非翻译区(Untranslated region, 5'UTR)长度 142 bp, 3'UTR 长度 4390 bp。ORF 长度 699 bp, 编码 232 个氨基酸, 预测分子量为 26.4 kDa, 等电点约为 5.08。牙鲈 *efhd2* 基因所编码的蛋白在第 89~117 以 125~153 位氨基酸具有 2 个典型的 EF-hand 结构域(图 1)。

表 1 牙鲈 *efhd2* 和 *tbc1d25* 基因序列扩增和定量 PCR 引物信息

Tab.1 Primers information for cloning and Q-PCR of *efhd2* and *tbc1d25* in *Paralichthys olivaceus*

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	功能 Application
<i>efhd2</i> -F	GCCGACGGCTTCAGATAGAA	<i>efhd2</i> 中间片段验证
<i>efhd2</i> -R	GGAGCACCAAGCTTCTCCAT	
<i>tbc1d25</i> -F	GTGTCGAGATAGGAGCGGTG	<i>tbc1d25</i> 中间片段验证
<i>tbc1d25</i> -R	AGGCTTGATCTCCTCCCAT	
<i>efhd2</i> -5'RACE-F1	TGAAGCTGAGTTTGTGTCCAG	<i>efhd2</i> 基因 5'RACE
<i>efhd2</i> -5'RACE-F2	CTTCTCCAIGTCCTTGATCTGC	
<i>efhd2</i> -3'RACE-F1	GCTGTTGGCAGTATTTAATGTTGAT	<i>efhd2</i> 基因 3'RACE
<i>efhd2</i> -3'RACE-F2	CTGTTGTTACACATCCCATCCTTC	
<i>tbc1d25</i> -5'RACE-F1	CAGCACCGCTCCTATCTCGACAC	<i>tbc1d25</i> 基因 5'RACE
<i>tbc1d25</i> -5'RACE-F2	GCTCTGATGAGAATGTGCTGC	
<i>tbc1d25</i> -3'RACE-F1	ACTGGTCTCTGTCTCTGATGTTGTG	<i>tbc1d25</i> 基因 3'RACE
<i>tbc1d25</i> -3'RACE-F2	GAGCAAGCCGGGTGAAAAGTATG	
<i>efhd2</i> -RTF	GTCAACTGTGAAGTGTGCTGAATAAG	<i>efhd2</i> 基因荧光定量 PCR
<i>efhd2</i> -RTR	AAAGCCAACGTGATAATGTGTTACA	
<i>tbc1d25</i> -RTF	GACTGGGACATCATAAGCCCTAAA	<i>tbc1d25</i> 基因荧光定量 PCR
<i>tbc1d25</i> -RTR	TGCCAGAGACCTCGTCTTTT	
β -actin-F	AGGGAAATCGTGCGTGACAT	β -actin 荧光定量 PCR
β -actin-R	GCCCATCTCTGCTCGAA	

tbc1d25 基因全长为 3173 bp, 其中, 5'UTR 长度为 108 bp, 3'UTR 长度为 464 bp。ORF 长度为 2601 bp, 编码 866 个氨基酸, 预测分子量为 96.4 kDa, 等电点约为 5.47。TBC1D25 蛋白在 199~431 位氨基酸为典型的 TBC 结构域(图 2)。

SignalP 分析未发现 EFHD2 和 TBC1D25 蛋白具有信号肽。TMHMM 分析显示, 这 2 个蛋白均无跨膜区。采用 ExPASy 网站(<http://web.expasy.org/>)的

GOR4 工具预测 EFHD2 与 TBC1D25 蛋白质的二级结构。EFHD2 蛋白的 α -螺旋(Alpha helix, Hh)包含 150 个氨基酸残基, 占氨基酸残基总量的 64.38%; 延伸链(Extended strand, Ee)包含 10 个氨基酸残基, 占氨基酸残基总量的 4.29%; 无规卷曲(Random coil, Cc)包含 73 个氨基酸残基, 占氨基酸残基总量的 31.33%。在 TBC1D25 蛋白中, α -螺旋包含 274 个氨基酸残基, 占氨基酸残基总量的 31.60%; 延伸链包含 109 个氨

```

gttgatccccgagcgcagcagaacacacgcaccgtccgcgagcagcgcacattttctcaaacaccattttaagctattagagagaccgccgtctctcgcct
ctgtagtcaactgagccactcccgtgtttcgaaaATGACCACGGACGAGCTGTCGTGAAAGCTCAGCCGACGGCTTCAGATAGAAGAGGGGGCCGAGGACCTGTGGCC
M A T D E L S S K L S R R L Q I E E G A E D P V A
CTGGACCCGCCCCGACACAGAACGGCTCCAAGGAGAAGCCGAGCACCGCAACGCGGACTCGGAGCTGGGCGCAAATGTCCCGGAGAGGAGCTGAACGAGGGG
L D P P G H Q N G S K E K P S T A N A D S E L G A K L S R R G E L N E G
CAGGGGGAGCACTGTGAGCCAGCATGAAGGTGTTCAACCCCTACACCGAGTTCAAGGAGTTCCTCCGAAAGCAGATCAAGGACATGGAGAAGATGTTCAAATGTAT
Q G E H C Q P S M K V F N P Y T E F K E F S R K Q I K D M E K M F K M Y
GATGCTGGGAAAGACAACCTACATTGACCTAATGGAGCTGAAGTTGATGATGGAGAAGCTTGGTGTCTCCGACACACATTGGCTTAAAGAATATGATAAAGGAAGT
D A G K T G D A N Y I D L M E L K L M M E K L G A P Q T H I G L K N M I K E V
GATGAGGACTGGACAACTCAGCTTCAGAGAGTTCCTGCTGATCTTTAGGAAGGACAGAGGAGAGTGTGAGAGCAGCGGCCTCAGTGACCTTGTCTGCG
D E D L D N K L S F R E F L L I F R K A A A G E L S E D S G L S D L A R
CTCTCTGAAATCGATGTCTCTGACAGAGGGGTCAAAGGAGCCAAAGACCTTCTTTGAAGCTAAAGTCCAGGCCATCAATGAGTCCAGCGGTTTGGGACAGAGATCCG
L S E I D V S A E G V K G A K T F F E A K V Q A I N E S S R F E A E I R
CAGGAGCAGGAGGAGAAGAAGCAGGCTGATGAGCAGAAACAAAGACGAGAGGCTTCAAAGAATACAGTCAAGCTTCAAGTGAacccttctctcatctcagg
Q E Q E E K K K Q A D E Q K Q R R E A F K E L Q S A F K *
acccttcactctgtgctgactaacgtcaatgagtggttttgaatgccccatgtatgtcagacagtggttagtctcagctcagctcaaaatcccatatattgttatcaa
tagtcaaatcaatggactaggtacacgttgaaaaaatcaccactgtctatgcttatgtaggtaaatagatcaatgattcatctgtatatttagccttctagctcggct
acaccttccaatacttataaaagtttagtgcagctatagcaggattgtcagtagagtagtctttgctgatcctaatgaatggttctcacagtatcttctcattgggca
tagcgtctgcaatccaagaatctattttaccctaatatctactgtggctcactgtgctggcactgtggggctgctgaccagaggggctcagcaaaacaatgat
tactttccagagtagaaaaactctggctcctagagtcataaacagctgtcagtggttggcatttaacaacctcaactgtgtcctaaatcagcctgttctagtt
tgacagctctcctgtactgaaacgacaacacacacacactccagtcactgtgtgtttggacagatggctcttagatgaatcctaaactgtagttgaaa
tgactcagtgactcgttcttagtattgcatagactggtaatgaatgcacttattgactgtcttgactacagtgtagcttgccttaactatattgattgacttta
ctcattaaagaattcactactaaatccacagtgacactttgcagtctcataatcagcttgcacaattagtgccacatgttgacaaaatagctgagctctgaagttca
gtgtcagctctgtattttgtacaatcggttgggtggttattgactagattttgttggttgaggagtgtagttggtgatggacattcttgagcatcaagat
ttgcatgaaacctgggaagtacagacagcctataatacaattatgtttctggctcctcctagttttggctattgttctttcagcttctcattttattc
accaacttattgctgacatcaggggatgtattgactgaggtagtgcttaatttggagttcactccaaccatagggccatcagataatttcaattcaattggt
atctgagagtcaccgtgtagataccaatattgtcatctgcattaccttttagttgtcatttctctgatcgatagttgagtggtttggacttgtgcaccacagcaaaaa
tgaaagtcaataagcgttttccggacatgaccttctgagcgtatctggagaagtgggtctggactttctcctcagtttgcgtttacacatgaatgacacaacagga
gattctcactcagacaccttcttgggggtggtgcataagaggcagggtgtaattgctgtggagatcacatgtttctgtttacagtcacactccggcatcggca
cttatcgcaaaaagctccttgacatctttgtgtctttacgtgtatggctctgcctttacatccttagatgtccgttttctattttacacacactcactgcagtgaa
tctgtgggtggtatcctgtgtgtctcactcggctcattcagactgtctgcagacttaattgctaggggaacggccataggaagtctacacgaagtccggaggctt
tcaatcgtttgcgttcacatactctctggaaaatgtctggaggatctcaatctcctgagttgagtaaaatgtttccataactgaaaggaattatccaactttgcg
aataaggccaggctttttatcttgaactgttctactgtatgtatgtctcacctgatgaacctggaggtttaacacacaatcacatgtgccattatagcag
ttagcttagtgccacttacactgctttacattttcattgtaaaatcataactaatgtgaatcctcgatcatcagtgaaaccagccttttctaatcagccccattc
ctgccccttactctgtgagatcctgtgtattttctgtatccagtgaaatcattttacaaggttgcgcattttgacttacttgatcatttgatgtaagtgtctt
tatcaagaaatgttgatgtaaatgttaacttcaatcaagatgaaagtcctctgtttaaacaataggtgtaaatccttaagatcgtgtggaggatc
acagacagcaacccaagataatcagataataactggtactctatagatcagattatattgttccattttgaaagataatcagggaaatagatgtgatgttt
aacatactctcatctttcacaataaatggcataattacacctgttggctcactagtggtgacatttcaaaaactcattttaagtttacagacagtgagaacaaa
tagacaaatgaacaggtcacacagatccgactcgtcatgtgttttaataattttaaacttaaacagtggtttggtttggtgtaactgaattagcttctgttagt
tgatgagttaatggaccagtgcaaccatcgttaatttctgtcagtagttttgattgtagatagatattggttttaagtgacatattgtattgaaactgatcaaa
atgttgatccacatgagtgagtcgaagcaactaaatgaaaagcttccagtgatacactcacatattattatacattggcacccttatgtatcagaagtattctt
atgaatgctgtaccaacctttatgaccaatattatgttataaaacaaggcaaaagtgtattcaatgggtagttgatgactttttacatgatcttcaggattatcccg
taataaatcctaatctgagatctcctaatttttgtatgatggcacaggcagatttaaatctttataggagagatgtttatttttgctttgagccactgtgtaa
cgtattggggacaaatgtttggttagtactactcaataaatatgcaagaccttttagtatagttattgatagctgttgatgcatccaggatttcacagcatattg
tggctgaaatgatccttaataatgaaaggtatcctaattttttcttactctatgaaaaattctatgatcttttacttgatgaaagtttattgaaactcctct
agtttactgtttaaacattctagcaaaaccaaattgtgatttgtgttggcaacaagtgaggacagtcagtgagtagttgtaactgtgggtattgtcagatctgtc
atatgtatctcctgggttaattatttttagtaaggctcattgttttggtttgatagtccccaagctatttctgttataacacgacaatgttagctgtagtt
atatgcttactatattgacgtttttgttctaatttccaaatattcagaacaacataatcatttccattttgttattttgggggttaaaagataagccctgttt
aaatgcaaatcattcattgattcattgaactattgacactgtattatgtattggaggtttaagaggaacaacttcttaattattacaattcattccactgaa
cattcccttattactgatggaatccatgagttggagttgagtacactcactgtgtcatctactgaatttccaaatcttctattctgtttatgtccagataagtgca
aatgttgaactactgtaatggggcttctatgctacagcagcaaaaatgtaatggaataaaatgatatgacctataaaatattttatctttttatgttaagaaag
ctgttggcagtttaattgttgattctgttgttacacatcccacctcccattcatgtcatggataagagtttctgctgcagttcttgcagtttccacttggctgga
gagttgctatgaaagtttaggaattcaaaataaatgtacactctcatgttgttgcagtgccctccaagctcactgtggaagtcactgtgaactgtgctgaataag
acaattcaaaagtgagctggcaggactgagtagtctctgggctgtaacacattatcagttggcttttttaacatatacaatcagttttctctgctatggtttga
tttaatttccactctccttctgttttctgttagtttgaaggtgtactgtctgttgtgtaatacaaaagagaatattgttcaatgcagcttatgtttgatttt
caataaatgtcttgtgtataaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 1 牙鲈 *efhd2* 基因核苷酸序列及推测的氨基酸序列
 Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *P. olivaceus efhd2*

方框内为起始密码子和终止密码子，阴影部分为 EF-hand 结构域，下划线为 PolyA 序列
 Frames indicate the start codon and stop codon respectively, shadow region indicates the EF-hand domain, underline indicates the PolyA tail sequence

```

gaggaagtggagcagcgctagctccgatcctataatcgatcgccatgcactcttagaagcaaaacaagcccagaactagatcctgtc
cagcacgggctcttgaadATGSCCGGCGAGGAGGAGAGGGGGTGGTCCGTGTACAGAGTCAAGAAATGTGATGGCGTGTCTCCAGTGGAG
M A G E E E R G V V R V R V K K C D G V L P V E
TTTCGGTCTTTGCTGTTGATCCTCAGATAACATCACTGGAGTCTGTCAGCACATTCTCATCAGAGCCTTTGATTTGAATGGGAGCGG
F R S F A V D P Q I T S L E V L Q H I L I R A F D L N G K R
ACCTTTGGGATCAGTTACCTGTGCGAGATAGGAGCGGTGCTGAAATGTATCAGTCTCTGGCGTCAGACTGGGATTTGGATGTTGCATTT
T F G I S Y L C R D R S G A E M Y Q S L A S D W D L D V A F
GTCAGTGCAGCCAAACCGTACCTACAGCTCAAGATGGACGTAACACCTTCAGAAGACAGTCTGTAATGGAGGACTGGGACATCATAAGC
V S A A K P Y L Q L K M D V K P S E D S P V M E D W D I I S
CCTAAAGAGCTGATTGGCTCTGAGCAGCTTCTGGAGAAAGGAGGAGTCTGCGCATCCGCCGCTTCTCTTCACTCAGTCTACTG
P K D V I G S E Q L L G E R T R S L A S A A L P F T Q S L L
TCCCAGATGGGCGGACCTTGTCTAAAGTCCAGCAAGCTTTGAGTGGTCTTATGGGGAGGAGATCAAGCCTTTCAAGCCTCCTCAGT
S Q M G R R T L S K V Q Q A L S W S Y G E E I K P F K P P L S
GATGGTGTGATTCACAGTACTCAATGGTCAGGCAATTCAGCAGCCGAGAACTCAGACTGCGAATTCATCATGTTGGTGGTGGAG
D G E F H S Y L N G Q G Q L T R P E E L R L R I Y H G G V E
CCTTCACTGCGCAAGTGTGTGGCGGTACCTCCTGAATGTGTACCCTGATGGACTGAGTGGACAGGAAAGAATGGACTACATGAAGAGA
P S L R K V V W R Y L L N V Y P D G L S G Q E R M D Y M K R
AAGACAAGGGAGTATGACCAGTGAAGAGAGAGTGGACAGCCGAGTCTGAGGATCTTGAATTTATTCGAGGAAATGTTCTCAA
K T R E Y D Q L K R E W T A R V S H E D L E F I R G N V L K
GACGCTGAGAACGGACGGGCTCATCCGTAACGCTGGCTCAGAAGACAGTCCACATCTGACTGCACTTACAGACTGCTCACCACG
D V L R T D R A H P Y Y A G S E D S P H L T A L T D L L T T
TTTGCCATCACACTCCACAGATCATACTCAAGGCATGAGCGATACGCTCCCTATACTTGCAGTAATGGACAATGAGGCGCAT
F A I T H P Q I S Y C Q G M S D I A S P I L A V M D N E A H
GCCTTCAATTTGCTTTTGGCATAATGAAGCGTTTGGAGGAAACTTCGCTCCAGATGGGCAACTAATGTCTATCAAATTCAGCATTTA
A F I C F C G I M K R L E G N F R P D G Q L M S I K F Q H L
AAGTCTTCTGAGTACTCGGATCTGAATTTTACTTCTTACTGTTGTCGAGGAGTACGACCTCTTCTTCTGCTACCGTGCTG
K L L L Q Y S D P E F Y S Y L V S R G A D D L F F C Y R W L
CTTTTGGAGCTCAAGAGAGAATTTGCGTTTGTGATGCTTTGCGGATGCTTGAGTCCACCTGGAGCTCCCTTCTCCGGATCCGCTGAA
L L E L K R E F A F D D A L R M L E V T W S S L P P D P P E
ACCGAAGTGGAGTCTCGGACTGCCACTGGACACTGAACTGTGACTACAAAGAAAAGACAATTGAGACTGCCTCAGAGATGAT
T E V E L L G L P L D T D E T V T Y K E K T I E T C L R D D
AATGAACAAAAGAGAAGCAGCGGAGGAGACATATGTTGAGGCCTTCAAGAGAAGAAACAGATGCGAGCAGGAATGCCGTCATAGAACAA
N E Q K E K Q R R R H M L R P S R E E T D A S R N A V I E Q
AAAGAGAGGCAAAATGTTGGTGTGGAACAGGAAGTGGCAGTATTGTGATATTAATCAAGTAAGTCTGGTAAAGGCAGATGTTGTCAG
K E R Q N V G A G T G S D G S D C D I N Q V S L V K A D C Q
GCTCCTTTTGAAGCAACAAGTTTGGAGAGTTAAATACTATACTGCCAGAAATGAAGATAGCTTTGATATGGAAGATGGTGACCAA
A P F E K Q T S F G E F K Y Y T A R N E D S F D M E D G D Q
CCACAGGTGTGGCTGTTCAAAGTCCGTAAGTACTGAACATCTCAAGTCCGACTCCACAGTTGATAGTGAAGGATCCAGAAGGAAACA
P Q G V A V S K S V L N I S S R Q S T V D S E E D P E E R T
CCTCTCATAAAAACTGTGAAATTTGTTTCTCTCCAATATCATCACCTCACCTTTTCTAGTGGCTACCTATTTGAAAAAGTGGCTCC
P L I K N C E I G F S P I S S P H L F P S G L P I W K S G S
TCTGTGTCCGACATCTTCAAGTTTCCCTCCAGTGGCCAGGAGCTTCCAGACTCTCTCCAAGTCCACATCCCATCCCATCC
S V S P T S S V S S P S S W P G A S P D S P P R S T S P S P S
ACAAACAATGGAAGAGAGGCTTACCAAGCACTGTTCCAAAAATATTGACCTCTCCGCCAAGTGTCTCAGCAATACAGGAATCAACTCA
T N N G R E A L P S T V P K I L T S S A Q V L S N T G I N S
CCCACAACCCCACTGTAACCACTATTGATCTCCCTCCCACTCAGAATCGATCCCTTCTCTTCACTATTTTGTCTTTGGG
P T T P T V K P S I A S P S H P Q N R S L L S S P I L S F G
AGAGGTCCCTCGTTGTCTGGCAGCAGGTATCCACCAACAATCTTCTTACCAGGAAACAATCTCCAGCACCGCAGCTAACACACC
R G P S L S G S R S S T N N L P S P G N K S P S T A A N T P
AGTTCTGTAAGACTGAGACCACAGCATCAATCGTGTTCGCTGCCCTCCGCAAGAGTTCGGCAAGGATCCCTTTCATGCTGTTT
S S L K A E T T S I K S C S L P P P Q E F G K G N P F M L F
CTATGCCTGTCCATCCTGCTGGAGCACCGAGACCACATAATCAAGAACAGCTTGATTACAATGAGTTAGCCATGCACCTTTGATCGGCTA
L C L S I L L E H R D H I I K N S L D Y N E L A M H F D R L
GTGCGGCCACAACCTTAGCAGGTGCTGCAGCGAGCAAGGCCTTATTGCACTACTTGCAGAGTGAAGTGGGACTCAGAGGAA
V R R H N L S R V L Q R A K A L F A D Y L Q S E V W D S E E
GGAGATGAGGTTAGCTCCGACTCCCAACAACAATTACCGCTGTGCAACATCCCTTCTTCAACCATCTCTGCCAGGCCCATTTATAGC
G D E V S S D S P T T I T A V Q H S P S S T I S A R P I Y S
CCTTGTAGCATCGCTCAGTCACTTTCAAACTCAACTATAACCTACAACCACCATCCCTCCCAACAGCTCAAGTTTCCCTTTCC
P L A S P Q S S F Q N S T Y N L T T T I P S P T A Q V S L S
TCTGCTTCTGATcccatcatgcaacaattgattcccatcctcagcgaagactgattgtggcctgttggaggtgtccaccttttagcc
S A S *
agccttctaattgaattgggctgttaataatcttctcattctgtgtatgcttgaatgtatttatattgcttttgcagtttgatgaa
agagcttcattcttttcatgtcctctgttgttctgtatgcatgacgtttaaaccctgtgattcaggtgtcagattgtggggctgtctct
tattggtcttgcaaaactcagtttagccacatggtgcatttaacctgagttgcctcttttttaactttgtttacaacttatattat
gtccaataagccacaaaagtgtcttaactaaacacttgtgttactttagttaaaataaaaagggaattccacactctgatgtatcgaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 2 牙鲆 *tbc1d25* 基因核苷酸序列及推测的氨基酸序列
 Fig.2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *P. olivaceus tbc1d25*

方框内为起始密码子和终止密码子, 阴影部分为 TBC 结构域, 下划线为 PolyA 序列
 Frames indicate the start codon and stop codon respectively, shadow region indicates the TBC domain, underline indicates the PolyA tail sequence

基酸残基, 占氨基酸残基总量的 12.57%; 无规卷曲包含 484 个氨基酸残基, 占氨基酸残基总量的 55.82%。较之于 EFHD2 蛋白, TBC1D25 蛋白 α -螺旋含量比例少, 而延伸链和无规卷曲的含量比例较高。

2.2 多序列比对与系统发育树分析

将 EFHD2 蛋白分别与斑马鱼(*Danio rerio*)(NP_001313422.1)、青鳉(*Oryzias latipes*)(XP_023812778.1)、小鼠(*Mus musculus*)(NP_080270.2)和人(*Homo sapiens*)(NP_077305.2)的同源序列蛋白进行比较, 序列一致性分别为 83%、88%、73%和 72%(图 3)。利用 NJ 法对牙鲆 EFHD2 蛋白与其他 8 个物种的 EFHD2 蛋白氨

基酸序列进行系统进化树构建, 结果显示, 牙鲆 EFHD2 与半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)聚为一小支, 随后与青鳉、大西洋鲑(*Salmo salar*)、鲫鱼(*Carassius auratus*)和斑马鱼聚为一大支, 而小鼠、人和牛(*Bos taurus*)等哺乳动物则聚为另一支(图 4)。

TBC1D25 蛋白斑马鱼(NP_001121708.10)、青鳉(XP_011471287.2)、小鼠(NP_001159909.1)和人(NP_001335191.1)的同源序列一致性分别为 71%、74%、72%和 74%(图 5)。进化树结果表明, 牛、小鼠和人等哺乳动物聚为另一支, 6 种鱼类聚为另一支, 牙鲆在鱼类所构成的一支中, 先与半滑舌鳎聚为一支, 再与青鳉、大西洋鲑、鲫鱼和斑马鱼聚为一大支(图 6)。

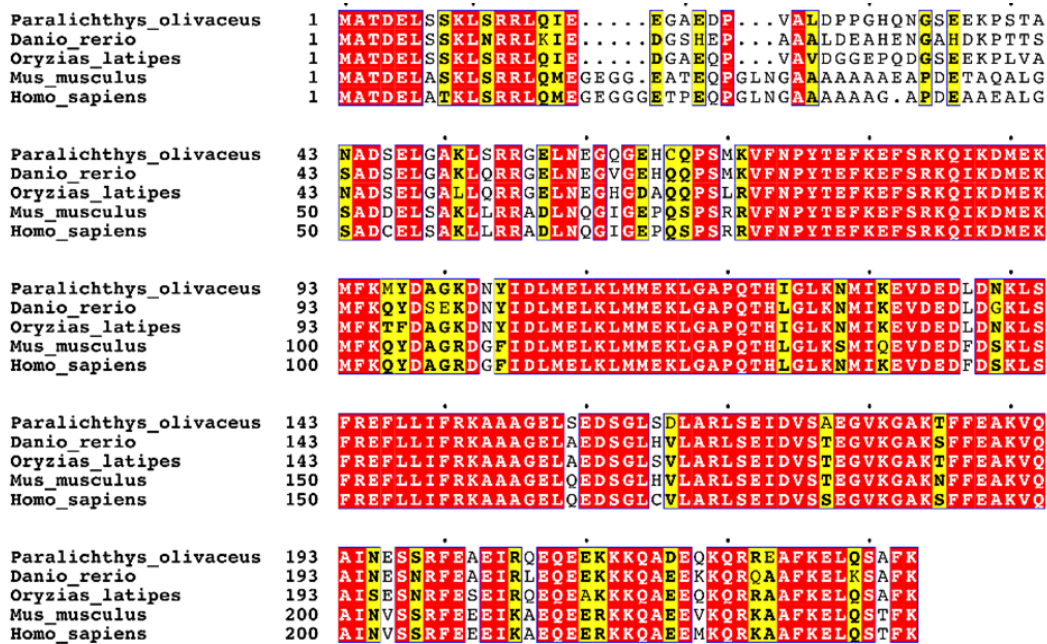


图 3 牙鲆 EFHD2 氨基酸多重序列比对结果

Fig.3 The multiple sequence alignment of the EFHD2 amino acid

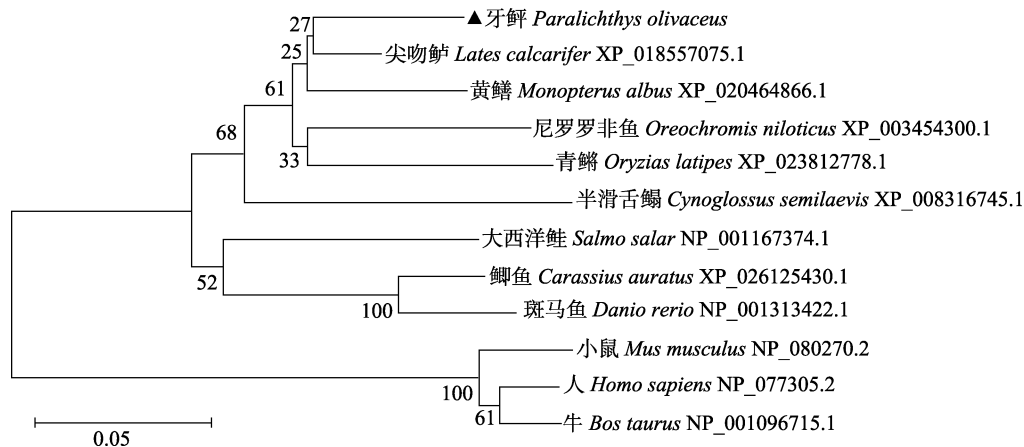


图 4 牙鲆 EFHD2 与其他物种 EFHD2 系统进化分析

Fig.4 Phylogenetic analysis of *P. olivaceus* EFHD2 amino acid sequence with EFHD2 sequences of other species

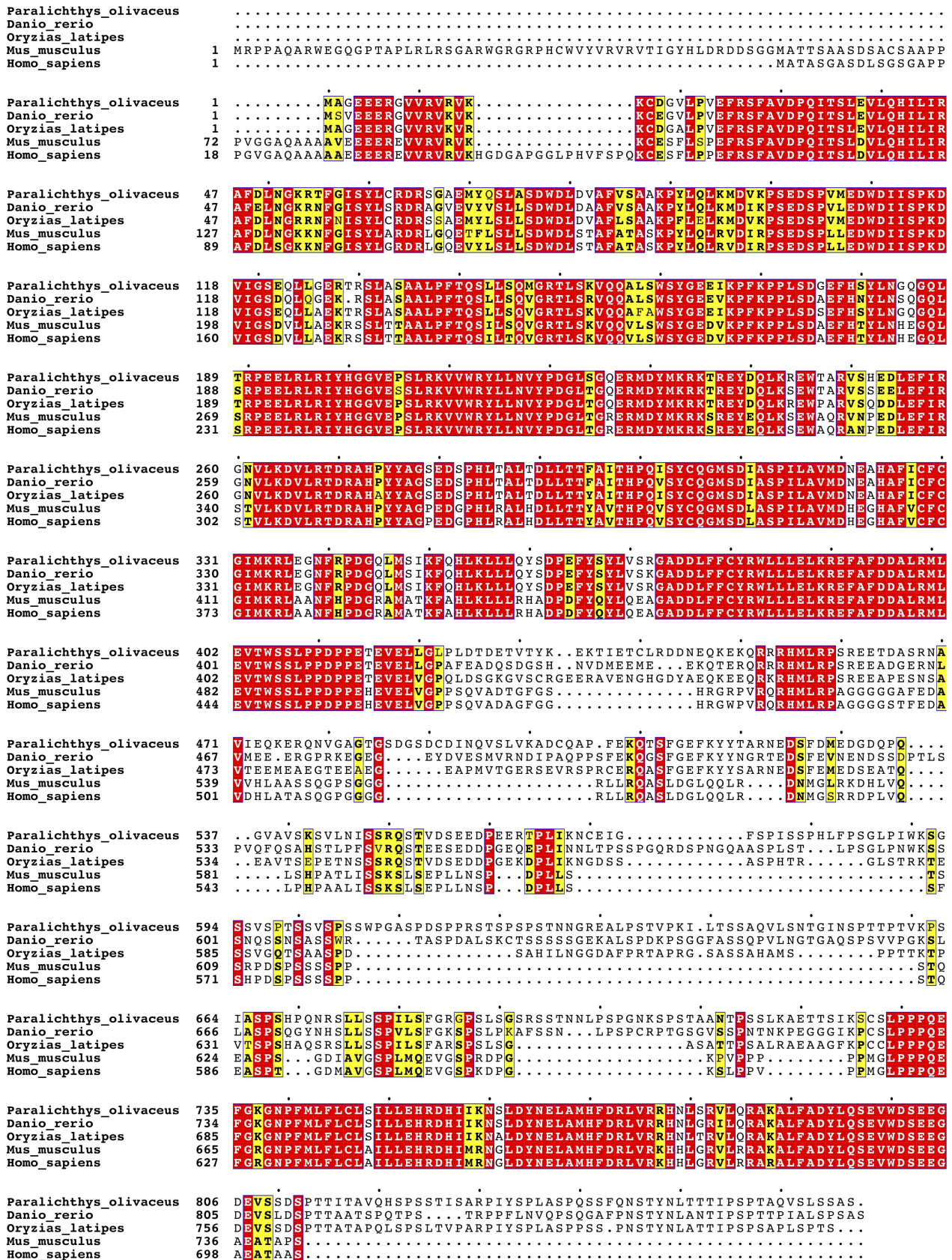


图 5 牙鲆 TBC1D25 氨基酸多重序列比对结果

Fig.5 The multiple sequence alignment of the TBC1D25 amino acid

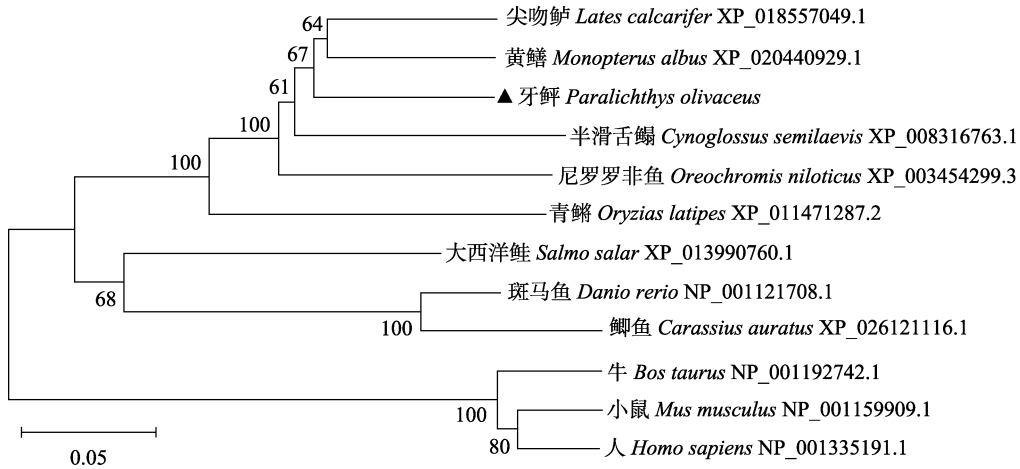


图 6 牙鲈 TBC1D25 与其他物种 TBC1D25 系统进化分析

Fig.6 Phylogenetic analysis of *P. olivaceus* TBC1D25 amino acid sequence with TBC1D25 sequences of other species

2.3 牙鲈 *efhd2* 与 *tbc1d25* 基因在胚胎发育各时期的表达

以 β -actin 为内参基因，利用荧光定量 PCR 检测了牙鲈受精卵、4 细胞、32 细胞、128 细胞、高囊胚、低囊胚、原肠早期、原肠晚期、肌节期、心跳期和出膜仔鱼中 *efhd2* 与 *tbc1d25* mRNA 的表达情况，并以原肠早期为基准进行相对表达量的计算。结果显示，*efhd2* 基因在胚胎发育的各个时期均有不同程度的表达(图 7)，但在 4 细胞、低囊胚和原肠早期的表达量相对较低，与其他时期差异显著($P<0.05$)；从肌节期开始，*efhd2* 的表达量开始呈上升趋势，且在出膜仔鱼中的表达量，显著高于其他各组($P<0.05$)。

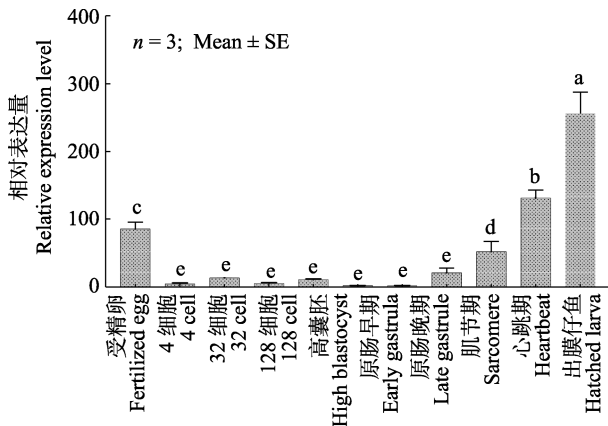


图 7 牙鲈 *efhd2* 基因在胚胎发育不同时期的相对表达
Fig.7 The relative expression level of *P. olivaceus efhd2* in different embryo development stage

误差线上方不同字母代表差异显著($P<0.05$)，下同
Different letters above the error bars indicate significant difference ($P<0.05$). The same as below

tbc1d25 基因在胚胎发育的各个时期也均有不同程度的表达(图 8)。其中，受精卵中的表达量显著高

于其他时期($P<0.05$)；随着发育的进行，*tbc1d25* 基因的表达量在原肠晚期降至最低($P<0.05$)；在之后的发育时期中，原肠晚期、肌节期和心跳期的表达量差异不显著($P>0.05$)；出膜仔鱼中 *tbc1d25* 的表达量又有一定的上升，显著高于除受精卵和 32 细胞之外的其他时期($P<0.05$)。

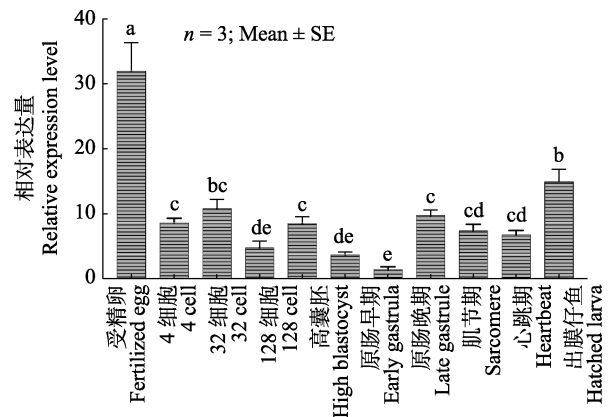


图 8 牙鲈 *tbc1d25* 基因在胚胎发育不同时期的相对表达
Fig.8 The relative expression level of *P. olivaceus tbc1d25* in different embryo development stage

2.4 牙鲈 *efhd2* 与 *tbc1d25* 基因在淋巴囊肿抗病和患病个体中的差异表达

以患病组性腺为基准进行 *efhd2* 和 *tbc1d25* 基因相对表达量的计算。*efhd2* 基因在所检测的淋巴囊肿抗病和患病个体的头肾、肝脏、血液、鳃、心脏、性腺、肌肉、肠和脾脏等组织中均有表达(图 9)。其中，在抗病鱼的血液、鳃、性腺、肌肉和脾脏的相对表达量要高于患病鱼，特别是在血液中，抗病鱼 *efhd2* 基因的表达量高于患病鱼，差异显著($P<0.05$)。

与 *efhd2* 基因相似，*tbc1d25* 基因在所检测的各

个组织中也均有表达(图 10)。其中,在抗病鱼的肝脏、血液、性腺的相对表达量要高于患病鱼,特别是在血液中的表达量,二者差异极显著($P<0.01$)。

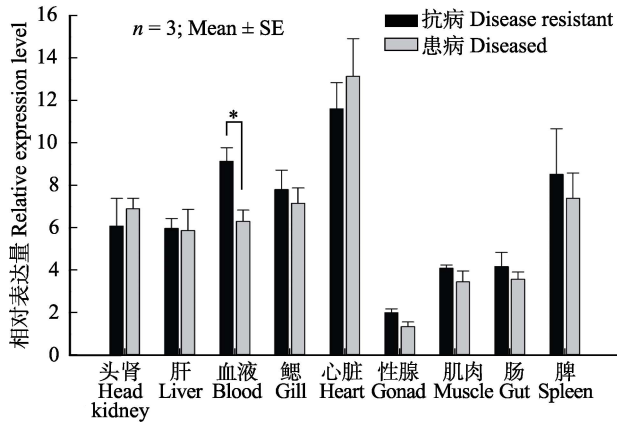


图 9 牙鲈 *efhd2* 基因在淋巴囊肿抗病和患病个体不同组织的相对表达

Fig.9 The relative expression level of *P. olivaceus efhd2* in different tissues of lymphocystis disease resistant and sensitive individuals

*为差异显著($P<0.05$)

*indicates significant difference ($P<0.05$)

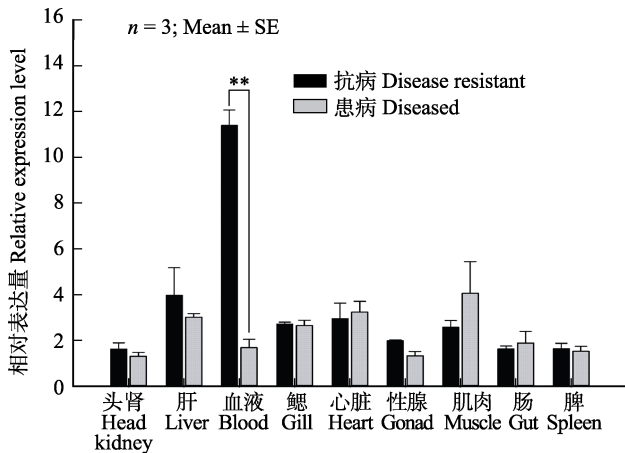


图 10 牙鲈 *tbc1d25* 基因在淋巴囊肿抗病和患病个体不同组织的相对表达

Fig.10 The relative expression level of *P. olivaceus tbc1d25* in different tissues of lymphocystis disease resistant and sensitive individuals

**为差异极显著($P<0.01$)

**indicates highly significant difference ($P<0.01$)

3 讨论

本研究克隆获得了牙鲈 *efhd2* 和 *tbc1d25* 基因的 cDNA 全序列,序列分析表明,上述 2 个基因都含有各自家族典型的结构域。同源性比较和系统进化树分

析显示,在鱼类中,2 个基因与其他鱼种具有较高的同源性,在进化上表现出一定的保守性。目前,关于 *efhd2* 和 *tbc1d25* 基因功能的研究,开展的较少,在鱼类上尚未见报道。

本文首次对 *efhd2* 和 *tbc1d25* 基因在牙鲈胚胎发育不同时期的表达模式进行了研究,在胚胎发育的各个时期,2 个基因均有不同程度的表达。*efhd2* 基因在受精卵中有一定量的表达,表明其可能为母源效应基因。其表达量在经过卵裂期到原肠晚期的低水平表达后,从肌节期开始,又显著上升。*efhd2* 是高度保守的钙结合蛋白,在神经和免疫细胞的 Ca^{2+} 信号传导中起重要作用(Brachs *et al*, 2013)。在牙鲈的胚胎发育中,自原肠后期开始,神经胚开始逐渐形成,神经细胞被大量生成,*efhd2* 基因在原肠后期开始所出现的表达水平提高,可能与之有关。

在所研究的胚胎发育各时期中,*tbc1d25* 基因在受精卵的表达量最高,表明其也是母源效应基因。*tbc1d25* 所属的 TBC 基因家族是真核细胞保守的膜转运蛋白,参与膜转运的各种步骤,包括囊泡形成、沿细胞骨架的囊泡运输、运输囊泡与靶膜的锚定/对接、以及运输囊泡与靶膜的膜融合等(Pereira-Leal *et al*, 2001; Grosshans *et al*, 2006; Schwartz *et al*, 2007; Fukuda, 2008; Stenmark, 2009; Frasa, 2012)。而在胚胎发育的各阶段,都离不开膜转运的参与,因此,*tbc1d25* 在此过程中可能起到一定的作用。

本研究中,牙鲈淋巴囊肿抗病个体血液中 *efhd2* 和 *tbc1d25* 基因的表达量都显著高于患病个体。鱼类免疫相关基因在血液中高表达的现象,在以往的研究中也有所报道。例如,在罗非鱼的 11 个组织中,血液里 *TRIM16* 和 *TRIM25* 的表达量最高(郑建美等, 2017)。血液是机体内不同器官间物质的传输介质。在牙鲈淋巴囊肿患病个体的心脏、头肾、脾脏和肠等内脏器官中均可检测到淋巴囊肿病毒颗粒(曲凌云等, 2000)。Kinne(1984)认为,鳃可能是淋巴囊肿病毒感染牙鲈的一个门户。病毒进入鳃之后,就需要通过连接各内脏器官的液体介质——血液进行传播。除了作为传输介质,血液也是重要的免疫器官,是 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞等各类免疫细胞的天然携带者,可在体内免疫应答过程中执行关键的生理和生化功能。随着血液流经整个机体,会将大量的免疫细胞从一个器官转移到另一个器官,从而充当免疫系统管道的角色,在鱼类疾病防治中发挥着重要的作用(Dalmo *et al*, 1997; Castillo *et al*, 1998)。就淋巴囊肿病毒感染而言,当病毒颗粒通过血液在不同器官间传输时,可能会激活血液中相关免疫细胞的免疫反应,从而导致包括

efhd2 和 *tbc1d25* 等在内的一系列基因的高表达。但有趣的是, *efhd2* 的功能是促进细胞凋亡, 而 *tbc1d25* 的潜在作用则是抑制自噬。细胞凋亡和自噬之间存在着复杂的调控关系, 彼此之间既可相互促进(Gorski *et al.*, 2003), 也可互为拮抗(Young *et al.*, 2006; Zeng *et al.*, 2012; Hassan *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016)。就本研究而言, 淋巴囊肿病毒感染牙鲆后, 抗病个体血液中的细胞凋亡和自噬互为拮抗关系。通过较高水平的细胞凋亡, 达到对因病毒感染所损伤血液细胞的消除, 从而恢复血液组成的动态平衡, 这可能对维持病毒感染后鱼体的正常生理水平和实现鱼体的抗病功能具有重要的作用。

作为重要的免疫器官, 头肾和脾的免疫功能已被广泛研究(Yang *et al.*, 2016; 张文婷等, 2016; 郑建美等, 2017)。免疫功能基因在头肾和脾的表达量, 受多种因素所影响, 并不一定高于其他组织。在半滑舌鳎中, *TLR5S* 基因在肝脏中的表达量最高, 而在脾的表达量最低(张文婷等, 2016)。在本研究中, 淋巴囊肿抗病和患病个体头肾和脾 *efhd2* 和 *tbc1d25* 基因的表达量差异不显著, 其可能原因为 *efhd2* 和 *tbc1d25* 基因在淋巴囊肿病毒进入鱼体经血液向其他组织扩散的阶段起到免疫作用, 但具体原因有待于深入研究。

综上所述, 本研究报道了牙鲆 *efhd2* 和 *tbc1d25* 基因的分子特征, 分析了它们不同胚胎发育过程以及淋巴囊肿抗病和患病不同组织的表达情况特征, 为进一步研究二者的功能和牙鲆淋巴囊肿抗病机理奠定了一定的理论基础。

参 考 文 献

- Anders K. Lymphocystis disease of fishes, in viruses of lower vertebrates. Heidelberg: Springer, 1989, 141–160
- Avramidou A, Kroczeck C, Lang C, *et al.* The novel adaptor protein Swiprosin-1 enhances BCR signals and contributes to BCR-induced apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 2007, 14(11): 1936–1947
- Brachs S, Lang C, Buslei R, *et al.* Monoclonal antibodies to discriminate the ef hand containing calcium binding adaptor proteins EFhd1 and EFhd2. *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*, 2013, 32(4): 237–245
- Castillo A, Razquin B, Villena AJ, *et al.* Thymic barriers to antigen entry during the post-hatching development of the thymus of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish & Shellfish Immunology*, 1998, 8(3): 157–170
- Chen Z, Jin T, Lu Y. AntimiR-30b inhibits TNF- α mediated apoptosis and attenuated cartilage degradation through enhancing autophagy. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2016, 40(5): 883–894
- Corona AK, Jackson WT. Finding the middle ground for autophagic fusion requirements. *Trends in Cell Biology*, 2018, 28(11): 869–881
- Dalmo RA, Ingebrigtsen K, Bøgvold J. Non-specific defense mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *Journal of Fish Diseases*, 1997, 20(4): 241–273
- Fan CX, Chen SL, Wang L, *et al.* Screening and identification of SSR markers associated with lymphocystis disease resistance in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(4): 577–583 [范彩霞, 陈松林, 王磊, 等. 牙鲆抗淋巴囊肿病相关 SSR 标记的筛选与鉴定. 水产学报, 2014, 38(4): 577–583]
- Frasa MAM, Koessmeier KT, Ahmadian MR, *et al.* Illuminating the functional and structural repertoire of human TBC/RABGAPs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2012, 13(2): 67–73
- Fuji K, Kobayashi K, Hasegawa O, *et al.* Identification of a single major genetic locus controlling the resistance to lymphocystis disease in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 2006, 254(1): 203–210
- Fukuda M. Membrane traffic in the secretory pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008, 65(18): 2801–2813
- Fukuda M. TBC proteins: GAPs for mammalian small GTPase Rab? *Bioscience Reports*, 2011, 31(3): 159–168
- Gorski SM, Chittaranjan S, Pleasance ED, *et al.* A SAGE approach to discovery of genes involved in autophagic cell death. *Current Biology*, 2003, 13(4): 358–363
- Grosshans BL, Ortiz D, Novick P. Rabs and their effectors: Achieving specificity in membrane traffic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(32): 11821–11827
- Hassan M, Selimovic D, Hannig M, *et al.* Endoplasmic reticulum stress-mediated pathways to both apoptosis and autophagy: Significance for melanoma treatment. *World Journal of Experimental Medicine*, 2015, 5(4): 206–217
- Hou JL, Wang GX, Zhang XY, *et al.* Analysis of growth and lymphocystis disease resistance of selected breeding families of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(4): 727–737 [侯吉伦, 王桂兴, 张晓彦, 等. 牙鲆抗淋巴囊肿病家系选育及生长和抗病性能分析. 中国水产科学, 2017, 24(4): 727–737]
- Hwang SD, Fuji K, Takano T, *et al.* Linkage mapping of Toll-like receptors (TLRs) in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Marine Biotechnology*, 2011, 13(6): 1086–1091
- Itoh T, Fukuda M. Roles of Rab-GAPs in regulating autophagy, in autophagy: Cancer, other pathologies, inflammation, immunity, infection, and aging. Cambridge: Academy Press, 2017, 143–157
- Itoh T, Kanno E, Uemura T, *et al.* OATL1, a novel autophagosome-

- resident Rab33B-GAP, regulates autophagosomal maturation. *Journal of Cell Biology*, 2011, 192(5): 839–853
- Kim YD, Kwon MS, Na BR, *et al.* Swiprosin-1 expression is up-regulated through protein kinase C- θ and NF- κ B pathway in T cells. *Immune Network*, 2013, 13(2): 55–62
- Kinne O. Diseases of marine animals. Volume IV, Part 1, Introduction, Pisces. Hamburg: Biologische Anstalt Helgoland, 1984, 1–541
- Kroczek C, Lang C, Brachs S, *et al.* Swiprosin-1/EFhd2 controls B cell receptor signaling through the assembly of the B cell receptor, Syk, and phospholipase C2 in membrane rafts. *Journal of Immunology*, 2010, 184(7): 3665–3676
- Liu HJ, Wang CA, Zhu XC, *et al.* Embryonic development of gynogenetic diploid and triploid Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2008, 23(3): 161–167 [刘海金, 王常安, 朱晓琛, 等. 牙鲆单倍体, 三倍体, 雌核发育二倍体和普通二倍体胚胎发育的比较. 大连水产学院学报, 2008, 23(3): 161–167]
- Ma HX, Wang L, Wang LQ, *et al.* The different expression patterns of the gene Arginase II in *Paralichthys olivaceus* and the correlation between its expression and *Edwardsiella tarda* infection. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(3): 44–52 [马慧鑫, 王磊, 汪林庆, 等. 牙鲆精氨酸酶II基因的克隆以及免疫应答表达分析. 渔业科学进展, 2018, 39(3): 44–52]
- Paperna I, Vilenkin M, Alves de Matos AP. Iridovirus infections in farm-reared tropical ornamental fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2001, 48(1): 17–25
- Pereira-Leal JB, Seabra MC. Evolution of the rab family of small GTP-binding proteins. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 313(4): 889–901
- Qu LY, Sun XQ, Zhang JX. Electron ultramicroscopic observation on lymphocystis disease of the left-eyed flounder *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Qingdao Ocean University*, 2000, 30(2): 105–110 [曲凌云, 孙修勤, 张进兴. 养殖牙鲆淋巴囊肿病的电镜观察. 青岛海洋大学学报, 2000, 30(2): 105–110]
- Schwartz SL, Cao C, Pylypenko O, *et al.* Rab GTPases at a glance. *Journal of Cell Science*, 2007, 120(22): 3905–3910
- Shao CW, Bao BL, Xie ZY, *et al.* The genome and transcriptome of Japanese flounder provide insights into flatfish asymmetry. *Nature Genetics*, 2017, 49(1): 119–124
- Si F, Sun ZH, Yu SS, *et al.* Analysis of the genetic variability of the captured population of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in the coastal releasing area of Qinhuangdao. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(6): 18–24 [司飞, 孙朝徽, 于姗姗, 等. 秦皇岛近海增殖放流区牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)回捕群体的遗传多样性分析. 渔业科学进展, 2017, 38(6): 18–24]
- Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, 10(8): 513–525
- Vega IE. EFhd2, a protein linked to alzheimer's disease and other neurological disorders. *Frontiers in Neuroscience*, 2016, 10: 150
- Vuadens F, Rufer N, Kress A, *et al.* Identification of swiprosin 1 in human lymphocytes. *Proteomics*, 2004, 4(8): 2216–2220
- Wei XL, Xu ZC, Wang GX, *et al.* pBACode: A random-barcode-based high-throughput approach for BAC paired-end sequencing and physical clone mapping. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(7): e52
- Wolf K. Fish viruses and fish viral diseases. New York: Cornell University Press, 1988, 476
- Wu R, Sheng X, Tang X, *et al.* Transcriptome analysis of flounder (*Paralichthys olivaceus*) gill in response to lymphocystis disease virus (LCDV) infection: Novel insights into fish defense mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(1): 160
- Wu R, Tang X, Sheng X, *et al.* Relationship between expression of cellular receptor-27.8kDa and lymphocystis disease virus (LCDV) infection. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0127940
- Yang Y, Huang YH, Yu YP, *et al.* RING domain is essential for the antiviral activity of TRIM25 from orange spotted grouper. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 55: 304–314
- Young ARJ, Chan EYW, Hu XW, *et al.* Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *Journal of Cell Science*, 2006, 119(18): 3888–3900
- Zeng R, Chen Y, Zhao S, *et al.* Autophagy counteracts apoptosis in human multiple myeloma cells exposed to oridonin *in vitro* via regulating intracellular ROS and SIRT1. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2012, 33(1): 91–100
- Zhang WT, Xiang JS, Li HL, *et al.* Molecular cloning, characterization, and expression of three *TLR5S* splicing variants in half-smooth tongue sole. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(1): 10–20 [张文婷, 向晋松, 李海龙, 等. 半滑舌鲷 *TLR5S* 三种剪切型基因的克隆及表达分析. 中国水产科学, 2016, 23(1): 10–20]
- Zheng FR, Sun XQ, Xing MQ, *et al.* Immune response of DNA vaccine against lymphocystis disease virus and expression analysis of immune-related genes after vaccination. *Aquaculture Research*, 2010, 41(10): 1444–1451
- Zheng JM, Gao FY, Lu MX, *et al.* Cloning and expression analysis of *TRIM16* and *TRIM25* genes from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2017, 25(6): 861–873 [郑建美, 高凤英, 卢迈新, 等. 尼罗罗非鱼 *TRIM16* 和 *TRIM25* 基因的克隆及表达分析. 农业生物技术学报, 2017, 25(6): 861–873]

Cloning and Expression Analysis of *efhd2* and *tbc1d25* Gene in Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*)

HOU Jilun¹, GUO Yanan², FU Yuanshuai², WANG Guixing¹,
ZHANG Xiaoyan¹, SUN Zhaohui¹, SI Fei¹, WANG Yufen¹①

(1. Beidaihe Central Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qinhuangdao 066100;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract The Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) is one of the most important marine culture species in China. However, the outbreak of diseases has seriously affected the industrial culture of this particular fish. Among these diseases, the one caused by the lymphocystis disease virus has been spreading widely and has resulted in severe economic losses every year. In order to select new varieties of Japanese flounder that are resistant to lymphocystis disease in China, and to elucidate the mechanism of disease resistance at the molecular level, we used a high-throughput sequencing technique to analyze the transcriptome of kidney tissues of the Japanese flounder, and screened out a number of functional genes closely related to resistance, including *efhd2* and *tbc1d25*. In this study, we cloned the full-length cDNA sequences of *efhd2* and *tbc1d25* by using RACE (rapid-amplification of cDNA ends). The *efhd2* gene was 5231 bp in length, of which the length of the 5' untranslated region (5' UTR) was 142 bp and the length of the 3' UTR was 4390 bp. The open reading frame (ORF) was 699 bp in length, and encoded 232 amino acids with a molecular weight of 26.4 kDa and an isoelectric point of about 5.08. The full length of the *tbc1d25* gene was 3173 bp, of which the 5' UTR length was 108 bp, and the 3' UTR length was 464 bp. The ORF was 2601 bp in length and encoded 866 amino acids with a molecular weight of 96.4 kDa and an isoelectric point of about 5.47. Multiple sequence alignment revealed that the amino acid sequences of EFHD2 have 83%, 88%, 73%, and 72% homology with *Danio rerio*, *Oryzias latipes*, *Mus musculus*, and *Homo sapiens* respectively; and those of TBC1D25 have 71%, 74%, 72% and 74% homology with these four species, respectively. The expression profiles of *efhd2* and *tbc1d25* were analyzed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Both *efhd2* and *tbc1d25* were expressed at the fertilized egg, 4-cell, 32-cell, 128-cell, high blastocyst, low blastocyst, early gastrula, late gastrula, sarcomere, heartbeat, and hatched larva stages. The expression level of *efhd2* in the 4-cell, low blastocyst and early gastrula stage was lower than that in other stages ($P < 0.05$); the expression level of *efhd2* began to increase from the sarcomere stage and reached the highest level at the hatched larva stage, and was significantly higher than that in other groups ($P < 0.05$). The expression level of the *tbc1d25* gene in the fertilized egg was significantly higher than that in other stages ($P < 0.05$); during development, the expression level of *tbc1d25* decreased to the lowest level in late gastrula ($P < 0.05$); there was no significant difference in the expression level of *tbc1d25* in late gastrula, sarcomere, and heartbeat stages ($P < 0.05$). In the lymphocystis disease-resistant and -sensitive individuals, the expression of *efhd2* and *tbc1d25* was detected in head, kidneys, liver, blood, gills, heart, gonads, muscle, intestine and spleen. The expression of *efhd2* and *tbc1d25* was significantly higher in the blood of lymphocystis disease-resistant individuals than in the lymphocystis disease-sensitive individuals. This study provides a basis for further studying the gene function of *efhd2* and *tbc1d25*, as well as the mechanism of disease resistance of the Japanese flounder to lymphocystis disease.

Key words Lymphocystis; Disease resistance mechanism; Blood; Embryonic development

① Corresponding author: WANG Yufen, E-mail: wangyf-8000@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180312002

http://www.yykxjz.cn/

周朝伟, 雷骆, 邓星星, 袁登越, 杨旻珉, 曹高祥, 朱海星, 李岩, 朱成科, 李代金, 唐仁军, 张桂众, 李路宽, 郑宗林. 银鲫 *crh* 基因的克隆、组织表达谱及其对摄食的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(3): 69–79

Zhou CW, Lei L, Deng XX, Yuan DY, Yang MM, Cao GX, Zhu HX, Li Y, Zhu CK, Li DJ, Tang RJ, Zhang GZ, Li LK, Zheng ZL. Cloning, tissue expression profiling, functional characterization of corticotropin-releasing hormone (*crh*) on feeding in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(3): 69–79

银鲫 *crh* 基因的克隆、组织表达谱 及其对摄食的影响*



周朝伟^{1#} 雷 骆^{1#} 邓星星¹ 袁登越² 杨旻珉¹
曹高祥¹ 朱海星¹ 李 岩¹ 朱成科¹ 李代金¹
唐仁军³ 张桂众³ 李路宽¹ 郑宗林^{1①}

(1. 西南大学动物科学学院水产系 重庆 402460; 2. 内江师范学院生命科学院 内江 641100;
3. 重庆市梁平区水产站 重庆 405200)

摘要 为研究 *crh* (Corticotropin-releasing hormone) 基因对鱼类摄食的调控作用, 首次克隆了银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) *crh* 基因 cDNA 全长序列。运用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 技术检测 *crh* 基因 mRNA 在不同组织的表达及餐前、餐后和禁食对其表达的影响。结果显示, 银鲫 *crh* 基因的 cDNA 序列全长为 920 bp, 其中, 5'-UTR 为 53 bp, 3'-UTR 为 378 bp, 开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 为 489 bp。推导银鲫 *crh* 基因的 ORF 区编码蛋白由 162 个氨基酸组成, 其中, 含有 11 个氨基酸的保守区, 24 个氨基酸的信号肽, 41 个氨基酸的成熟肽。氨基酸序列的多重比较分析显示, 银鲫 *crh* 基因与金鱼 (*Carassius auratus*) 的同源性为 99%, 与鲤 (*Cyprinus carpio*) 的同源性为 96%。荧光定量 PCR 表达分析显示, 银鲫 *crh* 基因在下丘脑中的表达量最高, 其次是端脑和心脏。*crh* 基因的表达量在餐前与餐后没有显著变化 ($P > 0.05$), 在禁食第 5 天、第 7 天出现极显著降低 ($P < 0.01$), 而在复投喂后第 9 天、第 11 天出现极显著升高 ($P < 0.01$)。以上结果显示, *crh* 基因在银鲫摄食调控方面可能扮演着重要角色。

关键词 银鲫; *crh* 基因; RT-qPCR; 基因表达; 摄食调控

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)03-0069-11

摄食是包括进食及觅食的复杂行为 (Simpson *et al*, 2016), 能为动物提供所必需的营养物质与能量, 维持动物生长、繁殖等活动。与哺乳动物一样, 鱼类摄食调控是一个复杂过程, 由大脑神经中枢调控, 通

过接收和处理来自大脑和外周组织内分泌的因子进行调控 (Volkoff, 2016)。迄今为止, 在鱼类上克隆和鉴定了大量与摄食调控相关的因子, 如 Ghrelin (Zhou *et al*, 2014、2016)、Leptin (穆方申等, 2017)、CRH

* 中央高校基本科研业务费专项资金 (XDJK2016C047) 资助 [This work was supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities]. # 并列第一作者: 周朝伟, E-mail: zcwzq666@163.com; 雷 骆, E-mail: 626279300@qq.com

① 通讯作者: 郑宗林, 副教授, E-mail: zhengzonglin@126.com

收稿日期: 2018-03-12, 收修改稿日期: 2018-04-15

(Corticotropin-releasing hormone)(Wang *et al.*, 2014), CCK (Cholecystokinin) (Zhang *et al.*, 2017), NPY (Neuropeptide Y) (Han *et al.*, 2014)等, 然而, 由于种间特异性, 同一个基因在不同鱼类的摄食调控作用不尽相同(Liu *et al.*, 2014; Jonsson *et al.*, 2010; 卢荣华等, 2015; Zhang *et al.*, 2013; Michel *et al.*, 2016; Fuentes *et al.*, 2012)。CRH 是脊椎动物中一种含 41 个氨基酸的脑神经递质调节肽(Vale *et al.*, 1981), 具有调节神经内分泌、自主反馈应激等作用(Chrousos *et al.*, 2017)。CRH 可以影响哺乳动物的各种生理行为, 如 CRH 对应激后小鼠行为具有一定调节作用(Fuzesi *et al.*, 2016), CRH 通过刺激 POMC(Proopiomelanocortin)和 ACTH (Adreno-cortico-tropic-hormone)的分泌, 可以影响绵羊繁殖(周梅等, 2017), 还具有维持能量平衡(Rabasa *et al.*, 2016)及调控食欲(Rayatpour *et al.*, 2017)等功能。鱼类 CRH 可以影响生长发育、调节能量(王宇等, 2014)、调控摄食(Matsuda, 2013)等。就摄食调控而言, 目前已有实验探究了齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenanti*) (Wang *et al.*, 2014)、金鱼(*Carassius auratus*) (Matsuda *et al.*, 2006) *crh* 基因对食欲的调节作用, 在其他鱼类上的研究还较为欠缺。

银鲫(*Carassius auratus gibelio*)是中国淡水养殖的重要品种之一, 营养价值高、生长速度快(方旭等, 2017), 在中国养殖范围广, 市场需求旺盛, 价格稳定, 养殖效益明显。到目前为止, 银鲫的摄食调控研究主要集中在饲料添加剂、环境调控等方面(张亚卓等, 2016; 尹子煜等, 2017), 从分子层面上对银鲫摄食影响因子与摄食调控、能量代谢之间关系的研究较少。

该研究克隆了银鲫 *crh* 基因的 cDNA 全长序列, 并进行了序列分析, 同时利用实时荧光定量 PCR 技术, 对 *crh* 基因在银鲫各组织及餐前、餐后和禁食状态下的相对表达量进行了研究, 以期通过对 *crh* 基因结构与功能的探索, 为建立合理的银鲫投饲策略和促银鲫快速生长提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物及实验设计

银鲫购于重庆荣昌双河鱼技中心, 买回后放入西南大学荣昌校区实验基地 10 个鱼缸(110 cm×44 cm×44 cm), 暂养 2 周, 水温为(23.0±2.0)℃, 光照为自然光(12 h L : 12 h D), 每天 09:00 和 17:00 使用通威 2.0 饲料进行投喂, 投喂量为鱼体重的 2%, 所有实验鱼在摄食和行为上无明显差异。

用于基因克隆的银鲫平均体重为(293.5±17.5) g,

用于组织表达实验的银鲫平均体重为(316.33±11.7) g, 雌雄比例均为 1 : 1。

餐前、餐后实验。银鲫平均体重为(308.7±17.5) g, 以 17:00 为采样时间节点 0 h, 分别在餐前 3 h(-3 h)、餐前 1 h(-1 h)、餐点(0 h)、餐后 1 h(+1 h)、餐后 3 h(+3 h) 采取银鲫下丘脑组织, 餐后 1 h(+1 h), 餐后 3 h(+3 h) 分别有 1 组禁食组, 每组采样 6 个重复。

长时间禁食实验。银鲫平均体重为(458.33±20.10) g, 随机选 5 组鱼作为长时间禁食组, 5 组为正常投喂组, 分别在禁食第 1、第 3、第 5、第 7 天的 17:30 对禁食组和正常投喂组进行采样。第 9 天禁食组重新投食, 并在第 9、第 11、第 14 天的 17:30 对复投喂组及正常投喂组进行采样(每组采样 6 个重复)。

1.2 主要试剂

Primer Script[®] RT reagent kit、RNAiso Plus 试剂、pMD19-T 克隆载体、DNA Marker 和 Loading Buffer 均购于大连宝生物工程公司。SMARTer[™] RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司。去离子水、DNA 胶回收试剂盒、2×Taq PCR Master Mix 及 DH5 α 感受态细胞购于天根生化科技公司。X-gal、氨苄青霉素和 IPTG 购于生工生物工程(上海)股份有限公司。Gold View 购自北京索莱宝科技公司。琼脂糖购自 AITresco 公司。

1.3 组织采样及 RNA 提取

crh 基因 cDNA 克隆使用脑组织, 组织表达实验采集了端脑、下丘脑、中脑、小脑、延脑、垂体、眼、心脏、肝脏、脾脏、前肠、中肠、后肠、头肾、中肾、红肌、白肌、皮肤、精巢及卵巢共 21 种组织样品。餐前、餐后和长时间禁食实验所取组织为下丘脑。采样时, 使用 MS-222 将实验鱼麻醉, 迅速取出所需组织, 用 0.6%生理盐水冲洗干净, 立即用滤纸吸干生理盐水, 再转移至液氮中冷冻, 最后转入-80℃冰箱保存备用。取出-80℃冻存的样品, 采用大连宝生物工程公司的 RNAiso Plus 试剂提取总 RNA, 测定其光密度(OD), 将 OD_{260 nm}/OD_{280 nm} 在 1.8~2.0 的 RNA 置于-80℃备用。

1.4 银鲫 *crh* 基因的克隆

从 GenBank 中下载硬骨鱼类 *crh* 基因序列进行比对, 获得保守区一致性的序列, 采用 Premier 3.0 设计 PCR 引物(表 1)。25 μ l 反应体系: 12.5 μ l 的 2×dNTP Mix (Invitrogen), 上下游引物各 1.25 μ l, 2.5 μ l 的 cDNA 及 7.5 μ l ddH₂O(Invitrogen)。PCR 反应参数:

预变性 94℃ 5 min, 94℃ 变性 30 min, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 35 个循环, 最后延伸 72℃ 8 min。扩增后的目的条带经琼脂糖凝胶回收, 连接至 pMD[®]19-T 载体(TaKaRa, 大连), 热激转化 DH5 α 感受态细胞后均匀涂布在含氨苄西林(Amp⁺)的 LB 固体培养基上, 置于 37℃ 培养箱中过夜, 将转化后形成的白色单菌落接种进 2 ml 含 Amp⁺ 的 LB 培养基中, 所有操作均按照快速抽提质粒的试剂盒说明书进行。酶切使用 *Sal* I 和 *Bam* H I, 取大约 500 ml 的经 1%

琼脂糖凝胶电泳鉴定后显示为阳性的克隆菌液送到大连宝生物工程公司测序。

根据已获得 *crh* 核心序列设计 RACE 的巢式引物: 3'Race 特异性引物和 5'Race 特异性引物(表 1)。参照 Clontech 公司的 SMARTer RACE cDNA 试剂盒说明书制备 5'-RACE-Ready cDNA, 采用 Touchdown PCR 反应进行 3'和 5'末端扩增, 扩增产物经胶回收、连接、转化后, 筛选阳性的克隆菌液送到大连宝生物工程公司测序。

表 1 实验所用引物
Tab.1 The primers used in this study

引物名 Primer name	引物序列 Sequence (5'~3')	用途 Purpose
<i>crh</i> -F	5'GCAAAGTTCAAAAACCATCC 3'	<i>crh</i> gene cloning
<i>crh</i> -R	5'GGTGGCTCATTAGTTTATTAAC 3'	<i>crh</i> gene cloning
<i>crh</i> -F1	5'CGGTTTTGGCACGCTTAGGGGAGGAGT3'	<i>crh</i> gene 3'RACE outer
<i>crh</i> -F2	5'CGCAGCGTCTGTTGGAGGGGAAAGT3'	<i>crh</i> gene 3'RACE inner
<i>crh</i> -R1	5'TCCAACCTTTCCCCTCCAACAGACGCT3'	<i>crh</i> gene 5'RACE outer
<i>crh</i> -R2	5'GGTGGTGGAAAGGCAACGAGCAGAG 3'	<i>crh</i> gene 5'RACE inner
<i>crh</i> -F3	5'GCTCGGTAACAGAAACCAGAAT3'	<i>crh</i> gene qPCR
<i>crh</i> -R3	5'CAACTTTCCCCTCCAACAGAC3'	<i>crh</i> gene qPCR
β -actin-F3	5'CGAGCTGTCTTCCCATCCA 3'	qPCR
β -actin-R3	5'TCACCAACGTAGCTGTCTTTCTG 3'	qPCR
18S-F	5'ACCACCCACAGAATCGAGAAA 3'	qPCR
18S-R	5'GCCTGCGGCTTAATTTGACT 3'	qPCR

1.5 基因序列分析

运用 BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对 cDNA 测序结果进行同源性比较。使用 SignalP Ver. 4.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)确认信号肽分位点和成熟肽。运用 ClustalW (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/clustalw-e.html>)多重序列比对分析氨基酸序列。通过 Mega 5.1, 采用邻接法(Neighbour-joining, N-J)构建系统进化树, 自展(Bootstrap)重复 1000 次。

1.6 实时荧光定量 PCR

通过实时荧光定量检测 *crh* 基因的组织表达谱、餐前餐后及禁食表达量。所有操作过程在 CFX96 Real-Time PCR 检测系统(Bio-Rad)上完成。荧光定量反应试剂采用 SYBR Green (TaKaRa, 大连), 20 μ l 反应体系: SYBR 10 μ l; 上下游引物各 0.8 μ l; 无菌水 6 μ l; cDNA 模板 2 μ l; Rox II 0.4 μ l。反应参数: 95℃ 预变性 30 s, 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 45 个循环。每个样品设置 3 个重复, 内

参基因为 18S rRNA 和 β -actin, 相对表达量通过公式 $E^{-\Delta\Delta C_t}$ (E 为扩增效率)计算。

1.7 数据统计及分析

用平均值 \pm 标准误(Mean \pm SE)表示实验数据, 并使用 SPSS 21.0 处理结果。用单因素方差分析法(One-way ANOVA)分析方差同质性检验后的数据, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 银鲫 *crh* 基因的克隆及序列分析

银鲫 *crh* 基因 cDNA(登录号 KY861383)全长 920 bp, 其中, 5'-UTR 为 53 bp, 3'-UTR 为 378 bp, 开放阅读框(ORF)为 489 bp。推导出银鲫 CRH 蛋白由 162 个氨基酸组成, 其中包含 24 个氨基酸组成的信号肽、41 个氨基酸构成的成熟肽和 11 个氨基酸构成的保守区(图 1)。通过氨基酸序列的多重比较分析发现, 银鲫 CRH 的氨基酸序列与鲤科鱼类具有较高同源性, 其中, 与金鱼的同源性为 99%, 与鲤的同源性

1	ACATGGGCAAGGATATATCAATTACGCACAGATTCTCCTCGCCACTTTTTGAC	53
54	ATG AAG CTC AAT TTT CTC GTC ACC ACC GTG GCT CTG CTC GTT GCC	98
1	M K L N F L V T T V A L L V A	15
99	TTT CCA CCA CCG TAT GAA TGT AGA GCC ATC GAA GGC AGC TCC AAC	143
16	F P P P Y E C R A I E G S S N	30
144	CAG CCA GCC ACG GAC CCC GAT GGA GAG CGA CAG GCC CCG CCG GTT	188
31	Q P A T D P D G E R Q A P P V	45
189	TTG GCA CGC TTA GGG GAG GAG TAC TTC ATC CGG CTC GGT AAC AGA	233
56	L A <u>R L G E E Y F I R L G</u> N R	60
234	AAC CAG AAT TAT CTC CGA TCC CCA GCC GAC AGC TTC CCC GAG ACA	278
61	N Q N Y L R S P A D S F P E T	75
279	TCC CAG TAT TCC AAA AGA GCA CTG CAG CTC CAG TTA ACG CAG CGT	323
76	S Q Y S K R A L Q L Q L T Q R	90
324	CTG TTG GAG GGG AAA GTT GGG AAC ATC GGT CGC TTG GAT GGC AAT	368
91	L L E G K V G N I G R L D G N	105
369	TAC GCG CTC CGG GCG CTC GAC TCA GTG GAG AGG GAG CGC AGG TCG	413
106	Y A L R A L D S V E R E R R <u>S</u>	120
414	GAG GAG CCG CCG ATT TCC CTG GAT CTG ACC TTT CAT CTG CTA CGA	458
121	<u>E E P P I S L D L T F H L L R</u>	135
459	<u>GAA GTA CTG GAG ATG GCC AGA GCC GAA CAA ATG GCC CAG CAA GCT</u>	503
136	<u>E V L E M A R A E Q M A Q Q A</u>	150
504	CAC AGC AAC CGC AAA ATG ATG GAA ATA TTC GGG AAG TAA	542
151	<u>H S N R K M M E I F</u> G K *	162
543	CCATGAGCAACCCCATCAGCCAAAGATATTTTACATTT _{ag} CACAGACATGAATATTCTG	602
603	TACCATAGTGCTGCTTTTCCATCATGATCTATTTATACCGGTGACTTATTTATTTGTAGA	662
663	TATTTCACTGAAGACGAATAGAGCACACTAGGTGTATATGAAGCGAAAACCTGTCATCAC	722
723	TCTCCATCAATGTTATTGTATAAGTGATCATTGAGAACTGTAGATGAAGAAAACGTTTGA	782
783	GTTTCTTTAAAAAAGACAATATTTTCCAGTACTGTATTATTTATCTGACAGACCTGA	842
843	GTTTCATTGTAACATACAGTACACTGTCTACGTTTGTAAATAAATAATGAGCAACCATT	902
903	GAAAAAAAAAAAAAAAAA	920

图1 银鲫 *crh* 基因 cDNA 序列及推导的氨基酸序列Fig.1 Nucleotide and predicted amino acid sequences of *C. auratus gibelio crh* gene

阴影部分表示信号肽区域。成熟肽氨基酸编码区用下划线，保守区用双下划线表示，*表示终止密码子

The signal peptide region is in in shade background. Mature peptide amino acid coding region is underlined. The conserved region in the cryptic peptide is shown in double underlined. The asterisk indicates the stop codon

为 96%，而与其他硬骨鱼及哺乳动物的相似性较低(图 2)。根据这些物种的氨基酸序列，使用 MEGA 5.1 软件，运用邻接法(N-J 法)绘制系统进化树(图 3)，结果显示，银鲫与金鱼亲缘关系很近，与鲤科鱼同源性最高，单独聚为一类，与其他硬骨鱼类的联系紧密，但与哺乳动物则相对较远。

2.2 银鲫 *crh* 基因在不同组织的表达分析

如图 4 所示，在银鲫的端脑、下丘脑、中脑、小脑、延脑、垂体、心脏、脾脏、肝胰脏、皮肤、眼、鳃、前肠、中肠、后肠、头肾、中肾、红肌、白肌、精巢、卵巢中均检测到了 *crh* 基因的表达，其中，下丘脑里的表达量最高，端脑和心脏次之，其余组织相对表达量较低。

2.3 餐前餐后银鲫下丘脑中 *crh* 基因的表达变化

结果显示，从餐前 3 h 至餐点 0 h，银鲫下丘脑中 *crh* 基因的表达量逐渐降低，但差异不显著($P>0.05$)。与禁食组相比，餐后 1 h 投喂组下丘脑中 *crh* 基因表达量明显升高，但未达到统计学差异显著水平($P>0.05$)；在餐后 3 h 投喂组下丘脑中，*crh* 基因表达量又降低到与禁食组基本一致($P>0.05$)(图 5)。

2.4 长时间禁食对银鲫 *crh* 基因表达的影响

从禁食第 1~7 天，禁食组下丘脑的 *crh* 基因表达量呈总体下降趋势，第 5、第 7 天禁食组下丘脑 *crh* 基因表达量极显著低于正常投喂组($P<0.01$)。在第 9、第 11 天复投喂后，实验组下丘脑 *crh* 基因表达量大幅上升，极显著高于正常投喂组($P<0.01$)(图 6)。

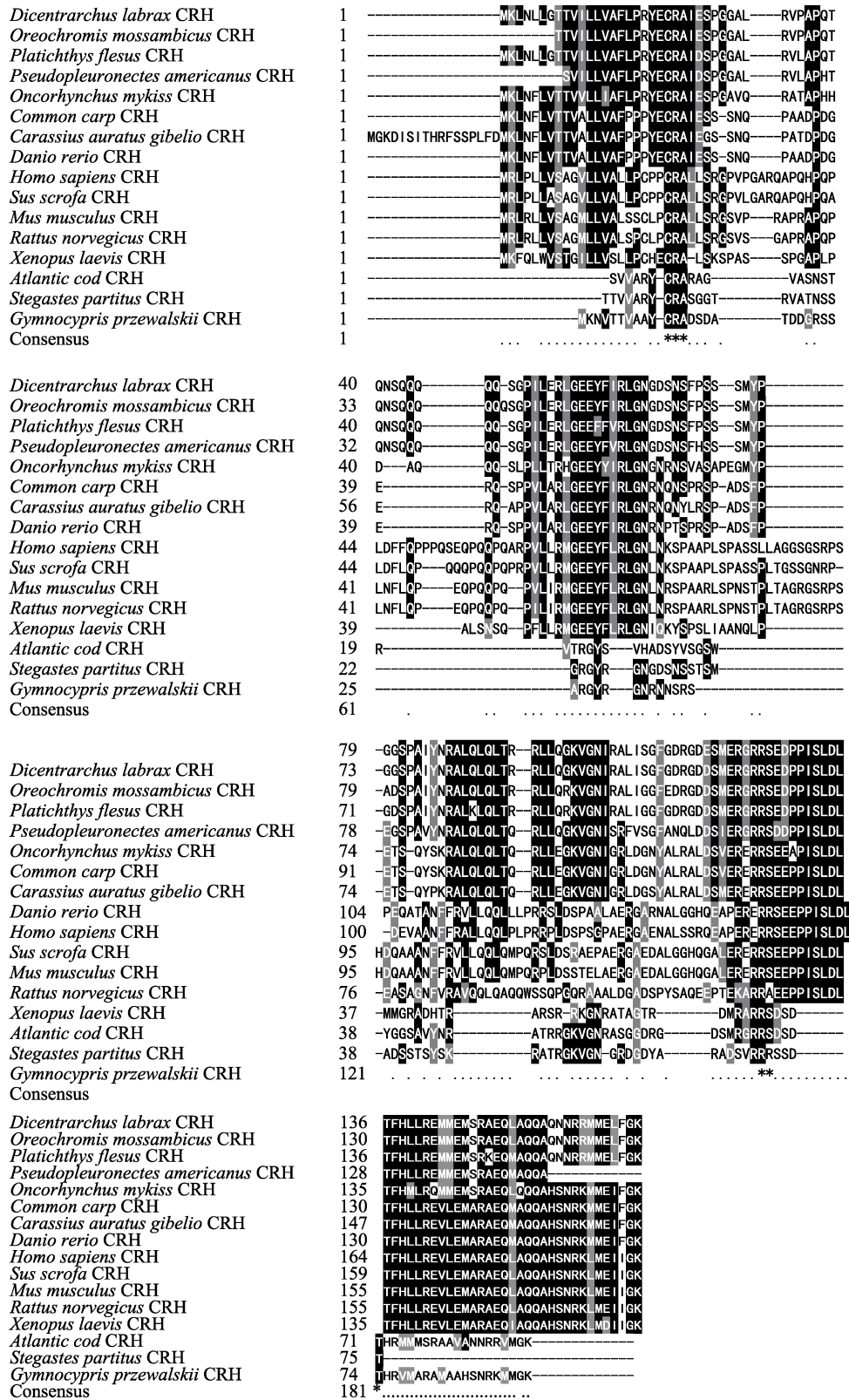


图 2 不同物种 *crh* 基因的氨基酸序列多重比较
 Fig.2 Amino acid sequences alignment of *crh* gene

阴影表示列表中超过一半的多肽残基序列为保守序列。
 More than half of the peptide residue sequences in the shading list are conserved sequences.
 The asterisk indicates that the amino acid sequence is exactly the same

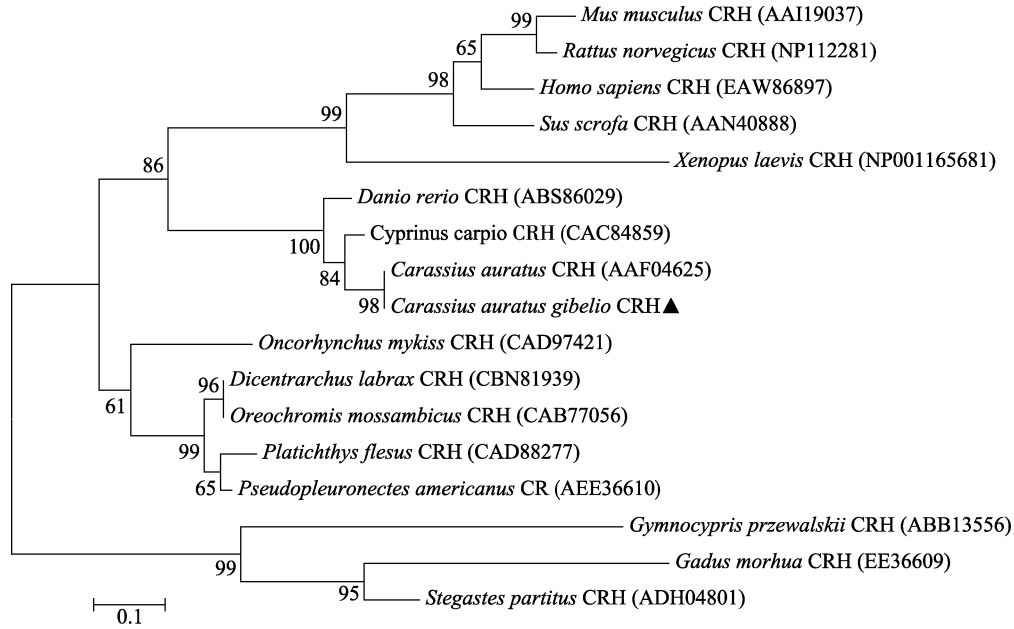


图3 CRH的氨基酸序列系统进化分析

Fig.3 The phylogenetic analysis of the amino acid sequences of *crh* gene from *C. auratus gibelio*

每个残基替代率由比例尺表示, 步长值由节点上的数字表示

Scale bar indicates residue replacement rate. The bootstrap value is represented by the numbers at the node

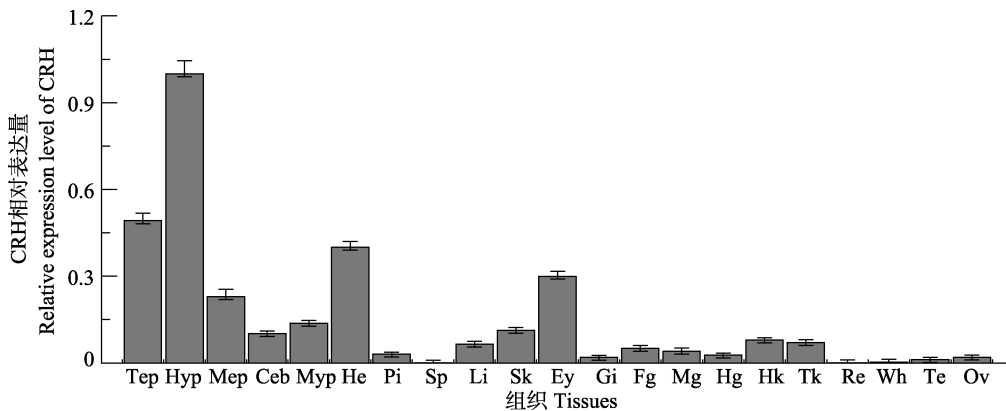
图4 银鲫 *crh* 基因的组织分布

Fig.4 Tissue distribution of *crh* gene in *C. auratus gibelio*

Tep: 端脑; Hyp: 下丘脑; Mep: 中脑; Ceb: 小脑; Myp: 延脑; Pi: 垂体;

He: 心脏; Sp: 脾脏; Li: 肝胰脏; Sk: 皮肤; Ey: 眼; Gi: 鳃; Fg: 前肠; Mg: 中肠; Hg: 后肠; Hk: 头肾;

Tk: 中肾; Re: 红肌; Wh: 白肌; Te: 精巢; Ov: 卵巢

Tep: Telencephalon; Hyp: Hypothalamus; Mep: Mesencephalon; Ceb: Cerebellum; Myp: Myelencephalon; Pi: Pituitary; He: Heart; Sp: Spleen; Li: Liver; Sk: Skin; Ey: Eye; Gi: Gill; Fg: Foregut; Mg: Midgut; Hg: Hindgut; Hk: Head kidney; Tk: Trunk kidney; Re: Red muscle; Wh: White muscle; Te: Testis; Ov: Ovary

3 讨论

3.1 银鲫 *crh* 基因生物信息学的分析

该研究首次克隆了银鲫 *crh* 基因 cDNA 的全长序列, 鉴定出 *crh* 基因的 1 种亚型。同样, 在齐口裂腹鱼(Wang *et al*, 2014)、刀鲚(*Coilia nasus*)(王宇等, 2014)

和黄斑篮子鱼(*Siganus canaliculatus*)(游翠红等, 2014)中也只鉴定出 *crh* 基因的 1 种亚型, 但有趣的是, 在草鱼(殷新平, 2015)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)(Doyon *et al*, 2006)和鲤(Huising *et al*, 2004)中鉴定出 *crh* 基因的 2 种亚型, 可能与鱼类基因组复制相关(Meyer *et al*, 2005; Sundstrom *et al*, 2008)。这些结果

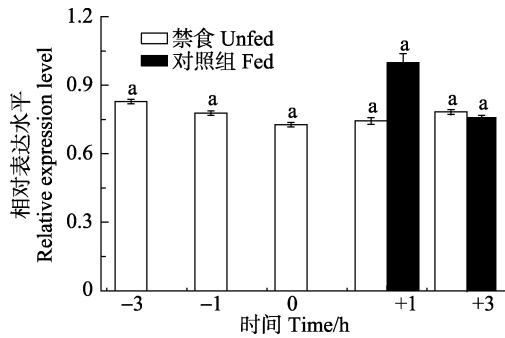


图5 餐前餐后银鲫下丘脑中 *crh* 基因的表达情况

Fig.5 Postprandial changes of the *crh* gene expression in the hypothalamus of *C. auratus gibelio*

图柱字母表示禁食组和投喂组(+1 h、+3 h)之间差异显著性
The fed and unfed groups that differ significantly are indicated by different letters above bars

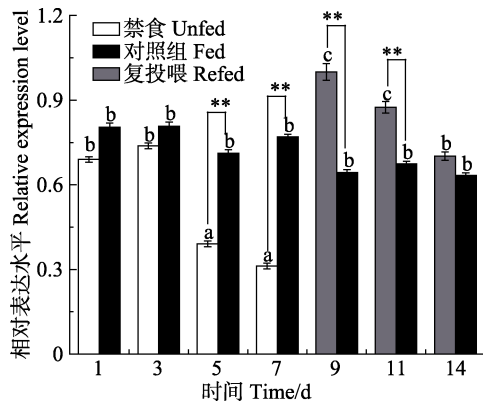


图6 禁食和复投喂对银鲫下丘脑 *crh* 基因表达的影响

Fig.6 Effects of fasting and refeeding on *crh* gene expression in *C. auratus gibelio* hypothalamus

图柱上的字母表示禁食组、正常投喂组及复投喂组之间的差异显著性;“*”表示同一时间实验组和正常投喂组间的差异显著性。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

Different letters on the bar represent significant differences between experimental groups. “*” represents significant differences between the experimental groups at the same time point. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

表明,硬骨鱼祖先额外的第3次全基因组复制导致的 *crh* 基因加倍后,部分硬骨鱼可能丢失了其中1个拷贝,而有些硬骨鱼在进化过程中可能保留或从其他途径获得2个拷贝,可能是导致目前观察到硬骨鱼基因组 *crh* 基因亚型个数多样性的重要原因。*crh* 基因进化可能在硬骨鱼进化中发挥非常大的作用,但其加倍后在硬骨鱼基因组产生多个亚型的具体机制以及各自生物学功能还有待深入研究。通过氨基酸序列结构的比较可知,银鲫 *crh* 基因的信号肽和成熟肽均较保守。通过对系统进化树分析发现,银鲫和金鱼亲

缘关系很近,与其他硬骨鱼类的联系紧密,但与哺乳动物则相对较远。

3.2 银鲫 *crh* 基因组织表达的分析

本实验使用 RT-qPCR 检测了银鲫 *crh* 基因在端脑、下丘脑、中脑等 21 个组织中的表达情况,结果显示,在银鲫下丘脑、心脏、肝脏等 21 个组织中均检测到 *crh* 基因表达,其中, *crh* 基因在下丘脑里表达量最高。此外, *crh* 基因的表达产物也广泛分布在褐牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)(沈娇娇等, 2017)、鲤(Mazon *et al*, 2006; Huising *et al*, 2007)、草鱼(*Ctenopharynodon idellus*)(殷新平, 2015)的各个组织中,脑部表达量最高。此外,在团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)(陈凯等, 2016),斑马鱼(Chandrasekar *et al*, 2010)、金鱼(Bernier *et al*, 1999)、比目鱼(*Pleuronichthys cornutus*)(Lu *et al*, 2004)的各组织中, *crh* 基因在脑部的表达量最高。在脊椎动物上已证实,下丘脑神经元回路对摄食行为和能量的调节起着重要作用(王国文等, 2016),并且 Wang 等(2014)对齐口裂腹鱼摄食调控的研究发现, *crh* 基因也在脑部的表达量最高。上述结果推测 *crh* 基因可能通过下丘脑对银鲫的摄食行为进行调控。此外,在外周组织如肝脏和精巢、卵巢中检测到 *crh* 基因的表达,说明 *crh* 基因可能参与到免疫应答(Vamvakopoulos *et al*, 2013; Tort, 2011)及繁殖过程(Jeong *et al*, 1999; Chabbi *et al*, 2014),具体机制还有待进一步研究。

3.3 银鲫 *crh* 基因对摄食调控的影响

摄食调控是一个复杂的生理过程,涉及中枢神经系统与外周神经系统相互作用,以及内分泌系统与消化之间的相互作用(Matsuda *et al*, 2007)。调控鱼类摄食行为因子的表达受摄食状态的影响,如饱食、饥饿及限制摄食等(Hoskins *et al*, 2012)。在哺乳动物与非哺乳动物中, *crh* 基因已被证明具有调节摄食行为的作用(Rayatpour *et al*, 2017; Volkoff, 2016)。本研究中,餐后 1 h 与禁食组和餐前相比,进食组下丘脑 *crh* 基因的表达量升高,但差异不显著($P > 0.05$)。同样,对齐口裂腹鱼的短期禁食发现,齐口裂腹鱼下丘脑中 *crh* 基因的表达量不受短期禁食影响(Wang *et al*, 2014),推测在银鲫中 *crh* 基因的表达量不受短期禁食的影响。

在长时间禁食实验中,第1、第3天禁食组的表达量低于正常投喂组,但差异不显著($P > 0.05$),第5、第7天禁食组 *crh* 基因表达量与正常投喂组相比,出现极显著下降($P < 0.01$)。第9天,复投喂组 *crh* 基因

表达量与正常投喂组相比, 出现极显著升高 ($P < 0.01$)。在齐口裂腹鱼的禁食实验中也得到相似结果(Wang *et al.*, 2014), 在第 1、第 3、第 5 天禁食组的 *crh* 基因表达量与对照组没有差异, 第 7 天禁食组 *crh* 基因的表达量显著低于进食组。在金鱼中, 长时间禁食会引起 *crh* 基因表达量的降低, 复投喂后又显著增加(Matsuda *et al.*, 2006)。根据以上结果推测, *crh* 基因可能作为一个饱感因子, 参与银鲫的摄食调控, 并且受不同禁食时间的影响, *crh* 基因表达量受长时间禁食影响, 而不受短期禁食调控。此外, Maruyama 等(2006)发现, 给金鱼脑室注射 CRH 后, 金鱼摄食能力降低, 活动能力有所提升; 此外, 给金鱼注射哺乳动物的 CRH 也会抑制其食欲(Matsuda *et al.*, 2013), 说明鱼类和哺乳动物 *crh* 基因在摄食调控中具有相似的生物学功能, 还有实验证明鱼类食欲可以被环境(秦希获等, 2017)、生理应激(穆小生, 2013)等抑制。Graf 等(2012)证明, 由应激引起的食欲抑制效应与 *crh* 基因及其相关肽表达量升高, 和下丘脑-垂体-肾上腺(HPI)应激轴激活紧密相关, 由于 *crh* 基因在下丘脑-垂体-肾上腺的应激过程中扮演着重要调节作用(殷新平等, 2014), 因此, 银鲫的 *crh* 基因可能通过激活下丘脑-垂体-肾上腺应激轴参与银鲫的摄食调控。

综上所述, 该研究确定了银鲫 *crh* 基因的 cDNA 序列, 并对其进行了分析。*crh* 基因广泛表达在银鲫各组织中, 下丘脑中表达量最高, 且下丘脑中 *crh* 基因的表达量受长期禁食的影响, 这些结果提示 *crh* 基因可能是银鲫的饱感因子, 对银鲫摄食调控起到一定的作用, 但具体机制有待进一步研究。

参 考 文 献

- Bernier NJ, Lin X, Peter RE. Differential expression of corticotropin-releasing factor (CRF) and urotensin I precursor genes, and evidence of CRF gene expression regulated by cortisol in goldfish brain. *General and Comparative Endocrinology*, 1999, 116(3): 461-477
- Chabbi A, Ganesh CB. Glucocorticoid synthesis inhibitor metyrapone blocks stress-induced suppression along luteinizing hormone secreting cells-ovary axis in the fish *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Experimental Zoology Part A Ecological and Integrative Physiology*, 2014, 321(3): 125-134
- Chandrasekar G, Lauterg, Hauptmann G. Distribution of corticotropin-releasing hormone in the developing zebrafish brain. *Journal of Comparative Neurology*, 2010, 505(4): 337-351
- Chen K, Xi BW, Teng T, *et al.* Molecular cloning, characterization, and regulation of *Megalobrama amblycephala* corticotropin-releasing hormone receptor expression. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(4): 833-845 [陈凯, 习丙文, 滕涛, 等. 团头鲂促肾上腺皮质激素释放激素受体基因序列特征及表达分析. *中国水产科学*, 2016, 23(4): 833-845]
- Chrousos GP, Zoumakis E. Milestones in CRH Research. *Current Molecular Pharmacology*, 2017, 10(4): 259
- Doyon C, Leclair J, Trudeau VL, *et al.* Corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y mRNA levels are modified by glucocorticoids in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, 2006, 146(2): 126-135
- Fang X, Teng SQ, Yang JL, *et al.* Pond high-yield, efficient and healthy aquaculture technology of *Carassius auratus gibelio*. *China Fisheries*, 2017(3): 91-92 [方旭, 滕淑芹, 杨建利, 等. "中科 3 号"异育银鲫池塘高产高效健康养殖技术. *中国水产*, 2017(3): 91-92]
- Fuentes EN, Kling P, Einarsdotti IE, *et al.* Plasma leptin and growth hormone levels in the fine flounder (*Paralichthys adspersus*) increase gradually during fasting and decline rapidly after refeeding. *General and Comparative Endocrinology*, 2012, 177(1): 120
- Fuzesi T, Daviu N, Wamsteeker CJI, *et al.* Hypothalamic CRH neurons orchestrate complex behaviours after stress. *Nature Communications*, 2016, 7: 11937
- Graf C, Kuehne C, Panhuysen M, *et al.* Corticotropin-releasing hormone regulates common target genes with divergent functions in corticotrope and neuronal cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2012, 362(1-2): 29-38
- Han J, Liu B, Jiang Z, *et al.* cDNA cloning of neuropeptide Y gene of turbot and its expression analysis for the strategy of starvation and feeding in industrial culture. *Engineering Sciences*, 2014-09
- Hoskins LJ, Volkoff H. The comparative endocrinology of feeding in fish: Insights and challenges. *General and Comparative Endocrinology*, 2012, 176(3): 327-335
- Huising MO, Lm VDA, Metz JR, *et al.* Corticotropin-releasing factor (CRF) and CRF-binding protein expression in and release from the head kidney of common carp: evolutionary conservation of the adrenal CRF system. *Journal of Endocrinology*, 2007, 193(3): 349-357
- Huising MO, Metz JR, Van SC, *et al.* Structural characterisation of a cyprinid (*Cyprinus carpio* L.) CRH, CRH-BP and CRH-R1, and the role of these proteins in the acute stress response. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2004, 32(3): 627-648
- Jeong KH, Jacobson L, Widmaier EP, *et al.* Normal suppression of the reproductive axis following stress in corticotropin-releasing hormone-deficient mice. *Endocrinology*, 1999,

- 140(4): 1702–1708
- Jonsson E, Kaiya H, Bjornsson BT. Ghrelin decreases food intake in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) through the central anorexigenic corticotropin-releasing factor system. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 166(1): 39
- Liu L, Liang XF, Li J, *et al.* Feed intake, feed utilization and feeding-related gene expression response to dietary phytic acid for juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquaculture*, 2014, 424–425(2): 201–206
- Lu RH, Sun JJ, Liang XF, *et al.* Biological characteristics and functions of Leptin in fish. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(3): 583–589 [卢荣华, 孙君君, 梁旭方, 等. 鱼类 leptin 的生物学特性及功能. *水生生物学报*, 2015, 39(3): 583–589]
- Lu W, Dow L, Gumusgoz S, *et al.* Coexpression of corticotropin-releasing hormone and urotensin i precursor genes in the caudal neurosecretory system of the euryhaline flounder (*Platichthys flesus*): A possible shared role in peripheral regulation. *Endocrinology*, 2004, 145(12): 5786
- Matsuda K, Hagiwara Y, Shibata H, *et al.* Ovine corticotropin-releasing hormone (oCRH) exerts an anxiogenic-like action in the goldfish, *Carassius auratus*. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 188(1): 118–122
- Matsuda K, Maruyama K. Regulation of feeding behavior by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in vertebrates. *Peptides*, 2007, 28(9): 1761–1766
- Matsuda K, Miura T, Uchiyama M, *et al.* Relationship between anorexigenic action of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and that of corticotropin-releasing hormone (CRH) in the goldfish (*Carassius auratus*). *Peptides*, 2006, 27(7): 1820–1826
- Matsuda K. Regulation of feeding behavior and psychomotor activity by corticotropin-releasing hormone (CRH) in fish. *Frontiers in Neuroscience*, 2013, 7(7): 91
- Mazon AF, Verburg-van Kemenade BM, Flik G, *et al.* Corticotropin-releasing hormone-receptor 1 (CRH-R1) and CRH-binding protein (CRH-BP) are expressed in the gills and skin of common carp *Cyprinus carpio* L. and respond to acute stress and infection. *Journal of Experimental Biology*, 2006, 209(3): 510–517
- Meyer A, Vav DPY. From 2R to 3R: Evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD). *Bioessays*, 2005, 27(9): 937–945
- Michel M, Page-Mccaw PS, Chen W, *et al.* Leptin signaling regulates glucose homeostasis, but not adipostasis, in the zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(11): 3084
- Mu FS, Miao L, Li MY, *et al.* Cloning and expression of Leptin gene in *Acrossocheilus fasciatus fasciatus* during fasting and refeeding. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2017, 48(4): 822–829 [穆方申, 苗亮, 李明云, 等. 光唇鱼 (*Acrossocheilus fasciatus*) Leptin 基因克隆及禁食–再投喂对其表达的影响. *海洋与湖沼*, 2017, 48(4): 822–829]
- Mu XS. Gene cloning, specific expression in different tissues and recombinant protein preparation of 4 biomarkers in *Scophthalmus maximus*. Master's Thesis of Ocean University of China, 2013, 91–92 [穆小生. 大菱鲆 4 种生物标志物基因的克隆、组织特异性表达研究及重组蛋白制备. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2013, 91–92]
- Qin XH, Wu YJ, Shi XT, *et al.* Effects of light intensity on the hatching rate of fertilized *Schizothorax chongi* eggs and on the growth and feeding of larvae. *Journal of Hydroecology*, 2017, 38(5): 97–102 [秦希获, 邬玉娇, 石小涛, 等. 光照对细鳞裂腹鱼受精卵孵化率及仔鱼生长、摄食的影响. *水生态学杂志*, 2017, 38(5): 97–102]
- Rabasa C, Dickson S L. Impact of stress on metabolism and energy balance. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 2016, 9(9): 71–77
- Rayatpour A, Ghasemi M, Radahmadi M, *et al.* Effect of intraparaventricular administration of corticotropin releasing hormone on food intake in food-deprived rats. *Journal of Isfahan Medical School*, 2017, 35(436): 70–775
- Shen JJ, Lü WQ. Effects of thyroid hormone on CRH gene expression in *Paralichthys olivaceus* at early development stage. *Journal of Southern Agriculture*, 2017, 48(2): 323–327 [沈娇娇, 吕为群. 褐牙鲈早期发育阶段 CRH 基因表达及受甲状腺激素的影响. *南方农业学报*, 2017, 48(2): 323–327]
- Simpson EH, Balsam PD. *Behavioral neuroscience of motivation*. Springer International Publishing, 2016: 1–12
- Sundstrom G, Larsson TA, Brenner S, *et al.* Evolution of the neuropeptide Y family: New genes by chromosome duplications in early vertebrates and in teleost fishes. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 155(3): 705
- Tort L. Stress and immune modulation in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 2011, 35(12): 1366
- Vale W, Spiess J, Rivier C, *et al.* Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science*, 1981, 213(4514): 1394
- Vamvakopoulos NC, Chrousos GP. Evidence of direct estrogenic regulation of human corticotropin-releasing hormone gene expression. *Journal of Clinical Investigation*, 2013, 92(4): 1896
- Volkoff H. The neuroendocrine regulation of food intake in fish: A review of current knowledge. *Frontiers in Neuroscience*, 2016, 10: 540
- Wang GW, Shao BP, Ding YP. The orexigenic role and

- mechanism of neuropeptide Y. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2016(2): 385–391 [王国文, 邵宝平, 丁艳平. 神经肽 Y 的促摄食作用及其调控机制. 动物营养学报, 2016(2): 385–391]
- Wang T, Zhou C, Yuan D, *et al.* Schizothorax prenanti, corticotropin-releasing hormone (CRH): Molecular cloning, tissue expression, and the function of feeding regulation. Fish Physiology and Biochemistry, 2014, 40(5): 1407–1415
- Wang Y, Lu DQ, Li WP, *et al.* The effect of acute handling stress on the stress-related neuroendocrine factor in *Coilia nasus*. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(6): 803–812 [王宇, 卢丹琪, 李伟萍, 等. 急性操作胁迫对刀鲚应激反应相关神经内分泌因子的影响. 水产学报, 2014, 38(6): 803–812]
- Yin XP, Su JM, Pu L, *et al.* Research on the effect of corticotropin-releasing hormone in stress reaction in the fishes. Chinese Journal of Fisheries, 2014(3): 57–61 [殷新平, 苏建明, 蒲龄, 等. 促肾上腺皮质激素释放激素在鱼类应激反应中的作用. 水产学杂志, 2014(3): 57–61]
- Yin XP. Cloning and expression of CRH, CRH-R1 from *Ctenopharyngodon idella*. Master's Thesis of Hunan Agricultural University, 2015, 42–43 [殷新平. 草鱼 CRH、CRH-R1 基因的全长克隆及表达分析. 湖南农业大学硕士学位论文, 2015, 42–43]
- Yin ZY, Xue M, Zheng YH, *et al.* Effect of yeast extract as feeding stimulants on diet preference of Gibel carp. Feed Industry, 2017, 38(8): 4–8 [尹子煜, 薛敏, 郑银桦, 等. 酵母提取物在异育银鲫饲料中促摄食作用的研究. 饲料工业, 2017, 38(8): 4–8]
- You CH, Lu YB, Wang SQ, *et al.* Cloning of gene encoding corticotrophin-releasing hormone (CRH) and its mRNA expression after shallow water stress in *Siganus canaliculatus*. Journal of Shantou University (Natural Science), 2014, 29(2): 43–51 [游翠红, 卢玉标, 王树启, 等. 黄斑蓝子鱼 CRH 基因的克隆及其在浅水应激后的 mRNA 表达. 汕头大学学报(自然科学版), 2014, 29(2): 43–51]
- Zhang H, Chen H, Zhang Y, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression profiles of multiple leptin genes and a leptin receptor gene in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). General and Comparative Endocrinology, 2013, 181(1): 295–305
- Zhang X, Tang N, Qi J, *et al.* CCK reduces the food intake mainly through CCK1R in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt). Scientific Reports, 2017, 7(1): 12413
- Zhang YZ, Zheng ZM, Hua JQ, *et al.* Bio-floc nutrition and nitrogen uptake by shrimp and silver prussian carp in polyculture brackish water. Journal of Ningbo University, 2016, 29(3): 29–33 [张亚卓, 郑忠明, 华建权, 等. 低盐度条件下生物絮团的营养组分及凡纳滨对虾和银鲫对其摄食效率的研究. 宁波大学学报(理工版), 2016, 29(3): 29–33]
- Zhou C, Zhang X, Liu T, *et al.* *Schizothorax davidi* ghrelin: cDNA cloning, tissue distribution and indication for its stimulatory character in food intake. Gene, 2014, 534(1): 72
- Zhou C, Zheng J, Luo L, *et al.* Evidence that ghrelin, may be associated with the food intake of gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). Fish Physiology and Biochemistry, 2016, 42(6): 1–10
- Zhou M, Di R, Hu WP. Different expression of CRH and POMC genes in reproductive related tissues in small-tail han sheep and sunite sheep. China Herbivore Science, 2017, 37(4): 1–4 [周梅, 狄冉, 胡文萍, 等. 小尾寒羊和苏尼特羊 CRH 和 POMC 基因在繁殖相关组织中的差异性表达. 中国草食动物科学, 2017, 37(4): 1–4]

(编辑 冯小花)

Cloning, Tissue Expression Profiling, Functional Characterization of Corticotropin-Releasing Hormone (*crh*) on Feeding in Gibel Carp (*Carassius auratus gibelio*)

ZHOU Chaowei¹, LEI Luo¹, DENG Xingxing¹, YUAN Dengyue², YANG Minmin¹, CAO Gaoxiang¹, ZHU Haixing¹, LI Yan¹, ZHU Chengke¹, LI Daijin¹, TANG Renjun³, ZHANG Guizhong³, LI Lukuan¹, ZHENG Zonglin¹①

(1. Department of Aquaculture, College of Animal Science, Southwest University Rongchang Campus, Chongqing 402460;

2. Department of Aquaculture, College of Life Sciences, Neijiang Normal University, Neijiang 641100;

3. Fisheries Administration of Liangping, Chongqing 405200)

Abstract To elaborate the mechanism of corticotropin-releasing hormone (*crh*) on feeding in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), we cloned and identified the full-length cDNA sequence of *crh* for the first time. We also employed real-time quantitative PCR (RT-PCR) to explore *crh* mRNA distribution in different tissues and investigated the expression of *crh* mRNA during postprandial and fasting. Here, a 920 bp full-length of *crh* gene cDNA was obtained, including a 53 bp of 5'-UTR, a 378 bp of 3'-UTR, and a 489 bp of an open reading frame (ORF). The ORF of the gibel carp *crh* gene contains 162 bp nucleotides, including an 11-amino acid conserved region, a 24-amino acid signal peptide, and a 41-amino acid mature peptide. The amino acid sequence of *crh* shares a high level of similarity with teleost CRH (99% with *Carassius auratus* and 96% with *Cyprinus carpio*). The expression of gibel carp *crh* was observed in almost all tissues, with the highest expression detected in the hypothalamus, followed by the myelencephalon and heart. There was no significant change in *crh* gene expression in the fed group compared with the fasted group in gibel carp hypothalamus after a meal ($P>0.05$). However, the expression level of the *crh* gene showed a significant decrease after fasting on day 5 and day 7 ($P<0.01$), a significant increase of the *crh* gene was observed after refeeding on day 9 and day 11. The results suggest that the *crh* gene may play a critical role in feeding regulation in gibel carp.

Key words *Carassius auratus gibelio*; *crh* gene; RT-qPCR; Gene expression; Feeding regulation

① Corresponding author: ZHENG Zonglin, E-mail: zhengzonglin@126.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180328001

http://www.yykxjz.cn/

赵彦花, 区又君, 李加儿, 温久福, 周慧. 黄唇鱼消化系统组织结构及黏液细胞分布特征. 渔业科学进展, 2019, 40(3): 80-86

Zhao YH, Ou YJ, Li JE, Wen JF, Zhou H. Histology and distribution of mucous cells in digestive system of *Bahaba flavolabiata*. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(3): 80-86

黄唇鱼消化系统组织结构及黏液细胞分布特征*

赵彦花^{1,2} 区又君^{1①} 李加儿¹ 温久福¹ 周慧^{1,2}

(1. 农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室 中国水产科学研究院南海水产研究所 广州 510300;

2. 水产科学国家级实验教学示范中心 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 利用石蜡切片、HE 和阿利新兰-高碘酸雪夫-试剂[AB-PAS (Alician blue and periodic acid Schiff reagent AB, pH 2.5)]染色技术, 研究黄唇鱼(*Bahaba flavolabiata*)消化系统的组织结构和黏液细胞的分布特征。黄唇鱼食道粗而短, 胃呈“卜”形, 分为贲门部、盲囊部和幽门部, 胃与肠的连接处有 8 条幽门盲囊, 肠道在体腔内迂回 2 个曲折。光镜下观察到消化管管壁由外至内依次为外膜、肌肉层、黏膜下层和黏膜层。食道肌肉层很厚, 黏膜层很薄, 未见黏液细胞分布。胃部肌肉层和黏膜层均很厚, 黏膜固有层分布胃腺, 黏膜上皮为单层柱状上皮。幽门盲囊管腔很大, 但肌肉层很薄。肠道肌肉层较厚, 黏膜皱褶较细长, 黏膜上皮细胞间可见圆形的黏液细胞。肝脏内弥散分布胰腺组织, 肝小叶内可见大量糖原空泡。AB-PAS 染色检测到胃部分布为红色的 I 型黏液细胞; 幽门盲囊黏膜上皮分布大量蓝色的黏液细胞, 为 II 型黏液细胞; 前肠、中肠和后肠检测到大量 II 型黏液细胞, 并有少量 I 型黏液细胞。黄唇鱼消化系统的组织结构以及黏液细胞分布特征体现了食性与结构功能相协调的特点。

关键词 黄唇鱼; 消化系统; 黏液细胞

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)03-0080-07

黄唇鱼(*Bahaba flavolabiata*), 闽粤人称金钱鲩、金钱猛鱼、大鸥、白花等, 温州人称黄甘, 属硬骨鱼纲、鲈形目、石首鱼科、黄唇鱼属, 是中国特有种, 分布于东海闽南渔场和南海北部珠江口渔场, 其中珠江口是盛产区。体长, 侧扁, 尾柄细长。近海暖温性稀有底层鱼类, 栖息于近海水深 50~60 m 海区, 幼鱼栖息于河口及其附近沿岸。为肉食性鱼类, 以小型鱼类和虾、蟹等大型甲壳类为食, 幼鱼则以虾类为食(钟俊生, 1991)。

由于环境的急剧恶化和过度捕捞, 其资源濒临灭绝, 1988 年黄唇鱼被列为国家二级重点保护野生动

物, 2006 年被世界自然保护联盟(IUCN)红色名录列为极度濒危物种(CR)。因此, 开展相关的调查和研究非常困难, 一直以来中国对于黄唇鱼生物学的研究报道较少, 目前, 中国水产科学研究院南海水产研究所在黄唇鱼耳石与年龄生长特性、肌肉和鱼鳔营养成分分析等方面已取得一些研究成果(区又君等, 2010、2011a、2011b、2012a、2012b、2012c、2014)。研究消化系统的组织结构以及黏液细胞的分布是分析鱼类生长发育、消化吸收以及适应环境等相互调节机制的有效手段, 目前, 国内外尚未见黄唇鱼在该领域的研究报道。本研究通过解剖学、组织学及组织化学技术研究黄唇

* 广州市科技计划项目(201604020088)资助 [This work was supported by Guangzhou Science and Technology Project (201604020088)]. 赵彦花, E-mail: zyhrenata@163.com

① 通讯作者: 区又君, 研究员, E-mail: ouyoujun@126.com

收稿日期: 2018-03-28, 收修改稿日期: 2018-04-20

鱼消化系统的形态特征、组织结构和黏液细胞分布特征,进一步了解和讨论黄唇鱼的摄食和消化吸收机理,可为黄唇鱼的人工养殖提供科学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

实验用鱼为广州市南沙海域渔民误捕受伤的黄唇鱼,共 3 尾(不分雌雄),体重为(295±68) g,全长(330±38) mm。现场经过测量体重、全长、体长后,置于冰上迅速解剖,取出消化道拍照,分离肝脏、食道、胃、幽门盲囊、前中后肠,各组织内容物经 PBS 冲洗,切成小块(2 cm×2 cm),用 4%多聚甲醛固定。

1.2 切片制备和染色方法

1.1 中的实验材料固定 24 h 后,用 70%~100%梯度酒精脱水,二甲苯透明,60℃熔点石蜡包埋,切片厚度为 5 μm,分别采用 HE 和 AB-PAS 试剂盒(由南京森贝伽生物科技有限公司提供,操作步骤参照试剂盒说明书)染色,中性树胶封片,制好后直接在 Zeiss 型显微镜下观察并拍照。HE 染色用于观察消化道组织结构,AB-PAS 染色用于检测消化道黏液细胞的分布。根据 AB-PAS 显色结果将消化道中的黏液细胞分成 I 型、II 型、III 型和 IV 型,分别呈红色(含有 PAS 阳性的中性黏多糖)、蓝色(含有 AB 阳性的酸性黏多糖)、紫红色(主要含有 PAS 阳性的中性黏多糖,同时含有少量 AB 阳性的酸性黏多糖)、蓝紫色(主要含有 AB 阳性的酸性黏多糖,同时含有少量 PAS 阳性的中性黏多糖)(谢木娇等,2015)。

1.3 数据测量和统计

参照林先智等(2016)的方法,每个样品组织随机选取 3 张切片,选取的切片在 Carl Zeiss Axio Scope.A1 型光学显微镜下观察,用 Cool Snap 3.3M 数码相机拍照。100 倍镜下观察,每张切片随机选取 3 块视野,对视野内的黏液细胞进行鉴别和计数,计得细胞总数按等级进行划分:-为未检测到;+为 1~5 个细胞;++为 6~10 个细胞;+++为 11~20 个细胞;++++为大于 20 个细胞。

2 结果

2.1 黄唇鱼消化系统的形态结构

黄唇鱼的消化道包含口咽腔、食道、胃、幽门盲囊、肠和直肠 6 个部分。黄唇鱼的口和咽界限不明显,所以合称为口咽腔,它的口咽腔比较大,腔内含有舌、

齿以及鳃耙。口咽腔后接食道,食道短而粗,内有纵行的皱褶,可以扩展,便于吞咽食物。胃呈“卜”形,分为贲门部、盲囊部和幽门部 3 部分。黄唇鱼有幽门盲囊 8 条,肠道在体腔内回折,有 2 个肠曲,按回折的折点将小肠分成前肠、中肠和后肠 3 个部分,后肠后接直肠,直肠较小肠稍粗,但不明显,其后为肛门。肝脏分为 2 叶覆盖在食道上方近胃贲门处,左叶短,右叶稍长,在胃幽门连接前肠的区域有幽门盲囊分布,在肠道转折往下的肠系膜上可见黑色的脾脏。

2.2 黄唇鱼消化系统组织结构

黄唇鱼食道分为黏膜层、黏膜下层、肌层和浆膜四层。食道黏膜和黏膜层、黏膜下层向腔面形成突起的皱襞,食道皱襞较高,黏膜表面覆有复层扁平上皮。食道肌肉层比较发达,主要由横纹肌构成,与其他肌层结构不同,它分为内纵肌和外环肌,伸缩性良好,有利于食物的吞咽,肌肉层发达与其肉食性相适应(图 1a)。胃贲门和胃幽门黏膜皱褶宽大,肌肉层发达是其共同特点(图 1b)。胃盲囊部黏膜上皮为单层柱状上皮,固有膜层是由 1 圈排列规则的腺细胞围成,呈圆形或椭圆形,中间形成 1 个空腔。固有膜中有胃腺,胃腺开口处为胃小凹,胃腺细胞呈柱状,核呈圆形,经过 HE 染色可以看见胃腺细胞核呈紫蓝色,胞质淡红色(图 1c)。黄唇鱼幽门盲囊管腔很大,但肌肉层很薄,上皮中黏膜褶数量比较多且有很多分支,互相交组织成网,几乎充满整个内腔,有较高的初级黏膜褶和分支的次级黏膜褶,黏膜上皮由单层柱状上皮细胞组成(图 1d)。前肠、中肠和后肠结构基本相似,肠黏膜上皮褶皱很丰富并且有分支,同幽门盲囊一样有初级黏膜褶和次级黏膜褶,肠道微绒毛发达,但前肠、中肠和后肠的绒毛高低、疏密存在差异。肠道上皮为单层柱状上皮,排列紧密,上皮散布有杯状细胞,细胞质染色较深,说明含有较多的酶类物质(王永翠等,2012)(图 1e~图 1i)。黄唇鱼肠道黏膜褶的高度、宽度及环肌、纵肌厚度见表 1。

肝脏是鱼类最大的消化腺体,在肝小叶内也可见胰腺的分布(图 1j)。肝小叶之间分布大小不同的血管,肝小叶内圆形的肝细胞排列成肝板结构,肝板之间分布的肝血窦清晰可见(图 1k),另外,肝细胞之间分布比较多的空泡,是储存糖原的结构(图 1l)。

2.3 黄唇鱼消化道黏液细胞分布特征

黄唇鱼食道内未发现黏液细胞,胃部、幽门盲囊和肠道均有黏液细胞分布,但不同区域黏液细胞种类和数量不同(表 2)。胃部均为红色的 I 型黏

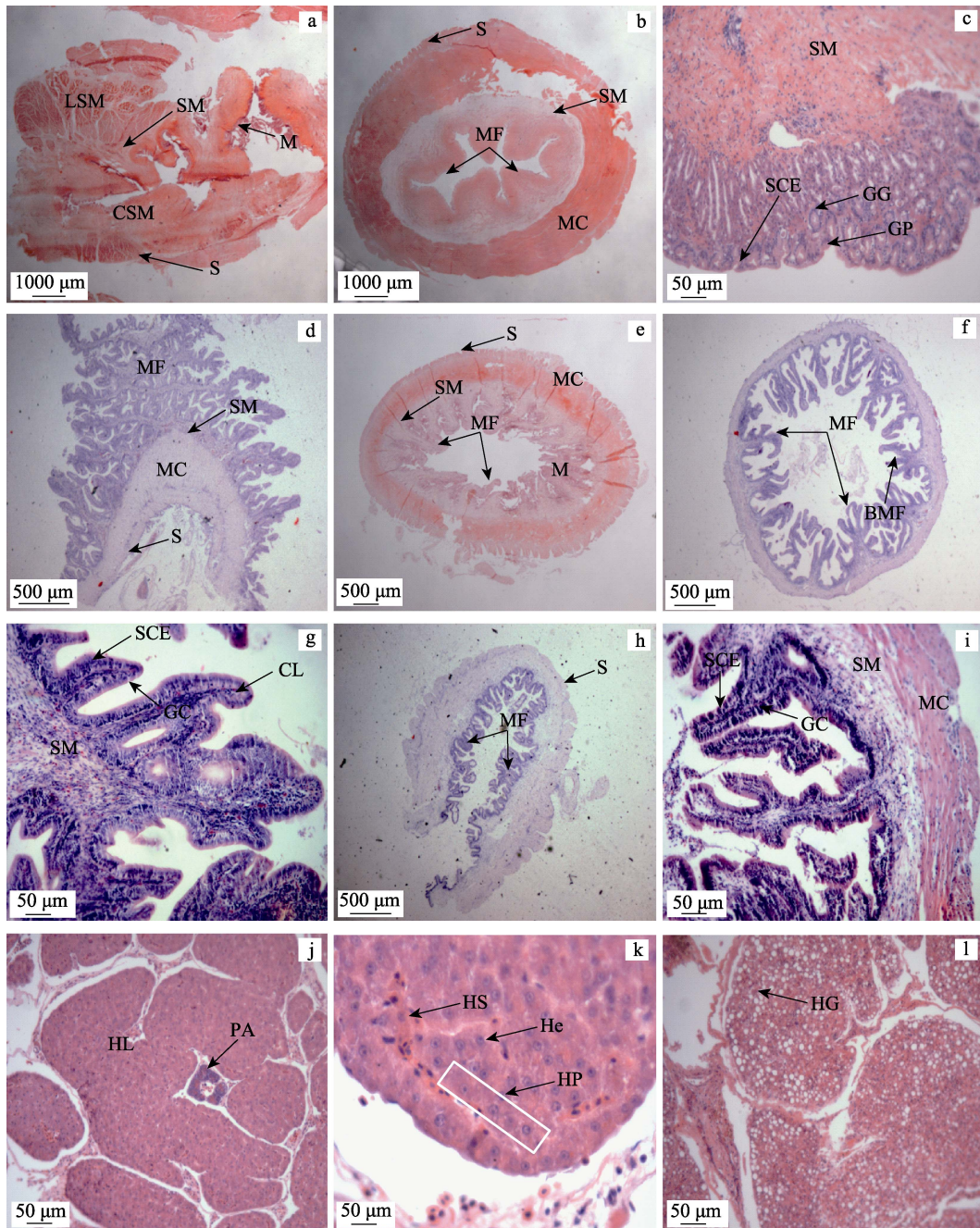


图1 黄唇鱼消化系统组织结构(HE染色)

Fig.1 Histology of digestive system in *B. flavolabiata* (H&E staining)

a: 食道横切, 6.5×; b: 胃幽门横切, 6.5×; c: 胃盲囊黏膜, 100×; d: 幽门盲囊横切, 20×; e: 前肠横切, 10×; f: 中肠横切, 16×; g: 中肠黏膜, 100×; h: 后肠横切, 16×; i: 后肠黏膜, 100×; j: 肝小叶, 100×; k: 肝小叶内部结构, 100×; l: 肝小叶内肝糖原空泡, 100×; BMF: 黏膜皱褶分支结构; CL: 中央乳糜管; CSM: 横肌; GC: 杯状细胞; GG: 胃腺; GP: 胃小凹; HL: 肝小叶; He: 肝细胞; HG: 肝糖原空泡; HP: 肝板; HS: 肝血窦; LSM: 纵肌; M: 黏膜层; MC: 肌肉层; MF: 黏膜皱褶; PA: 胰腺; S: 浆膜层; SEC: 单层柱状上皮; SM: 黏膜下层

a: Transverse section of esophagus, 6.5×; b: Transverse section of pyloric stomach, 6.5×; c: Transverse section of mucosa in fundic stomach, 100×; d: Transverse section of pyloric caeca, 20×; e: Transverse section of foregut, 10×; f: Transverse section of midgut, 16×; g: mucosa in midgut, 100×; h: Transverse section of hindgut, 16×; i: Mucosa in hindgut, 100×; j: Hepatic lobule, 100×; k: Structure of Hepatic lobule, 100×; l: Hepatic glycogen, 100×; BMF: Branch of mucosa fold; CL: Central lacteal; CSM: Circular layers of striated muscle; GC: Goblet cell; GG: Gastric gland; GP: Gastric pit; HL: Hepatic lobule; He: Hepatocyte; HG: Hepatic glycogen; HP: hepatic plate; HS: Hepatic sinusoid; LSM: Longitudinal layers of striated muscle; M: Mucosa; MC: Muscular coats; MF: Mucosa fold; PA: Pancreas; S: Serosa; SEC: Simple columnar; SM: Submucosa

表 1 黄唇鱼消化道各组织结构测量结果(单位: μm , $\bar{X}\pm S$)

Tab.1 The result of measurements in the digestive tract of *B. flavolabiata* (unit: μm , $\bar{X}\pm S$)

	幽门盲囊 Pyloric caeca	前肠 Anterior intestine	中肠 Middle intestine	后肠 Posterior intestine
黏膜褶皱高度 Plicamucosa height	55.97±11.18	43.66±12.23	55.15±10.65	18.39±1.90
黏膜褶皱宽度 Plicamucosa breadth	17.88±4.43	12.67±3.92	17.53±8.02	9.93±3.31
环肌层厚度 Thickness of circular muscle	14.15±0.88	9.21±0.46	12.19±0.75	7.01±1.86
纵肌层厚度 Thickness of longitudinal muscle	6.02±0.75	7.91±0.61	8.75±0.87	6.85±0.52

表 2 AB-PAS 染色方法检测黄唇鱼消化道黏液细胞的分布情况

Tab.2 Regional distribution and intensity of mucous cells in the the digestive tract of *B. flavolabiata* detected by AB-PAS staining technique

黏液细胞 Mucous cells	食道 Esophagus	胃 Stomach	幽门盲囊 Pyloric caeca	前肠 Anterior intestine	中肠 Middle intestine	后肠 Posterior intestine
I 型	-	++++	-	+	+	+
II 型	-	-	++++	++++	++++	++++

注: 内分泌细胞密度等级: -, 未检测到; +, 1~5 个细胞; ++, 6~10 个细胞; +++, 11~20 个细胞; +++++, 大于 20 个细胞

Note: The intensity grades of endocrine cells: -, not detected; +, 1~5 cells; ++, 6~10 cells; +++, 11~20 cells; +++++, more than 20 cells

液细胞, 分布在胃腺腔上皮和黏膜上皮细胞之间(图 2a)。幽门盲囊分布有大量蓝色的黏液细胞, 为 II 型黏液细胞, 多为圆形, 主要分布在单层黏膜上皮细胞之间(图 2b)。前肠、中肠和后肠检测到大量 II 型黏液细胞, 并有少量 I 型黏液细胞。I 型黏液细胞不大, 分布在黏膜上皮的基底层。II 型黏液细胞数量极多, 比 I 型黏液细胞大, 分布在上皮游离面(图 2c~图 2f)。

量 II 型黏液细胞, 并有少量 I 型黏液细胞。I 型黏液细胞不大, 分布在黏膜上皮的基底层。II 型黏液细胞数量极多, 比 I 型黏液细胞大, 分布在上皮游离面(图 2c~图 2f)。

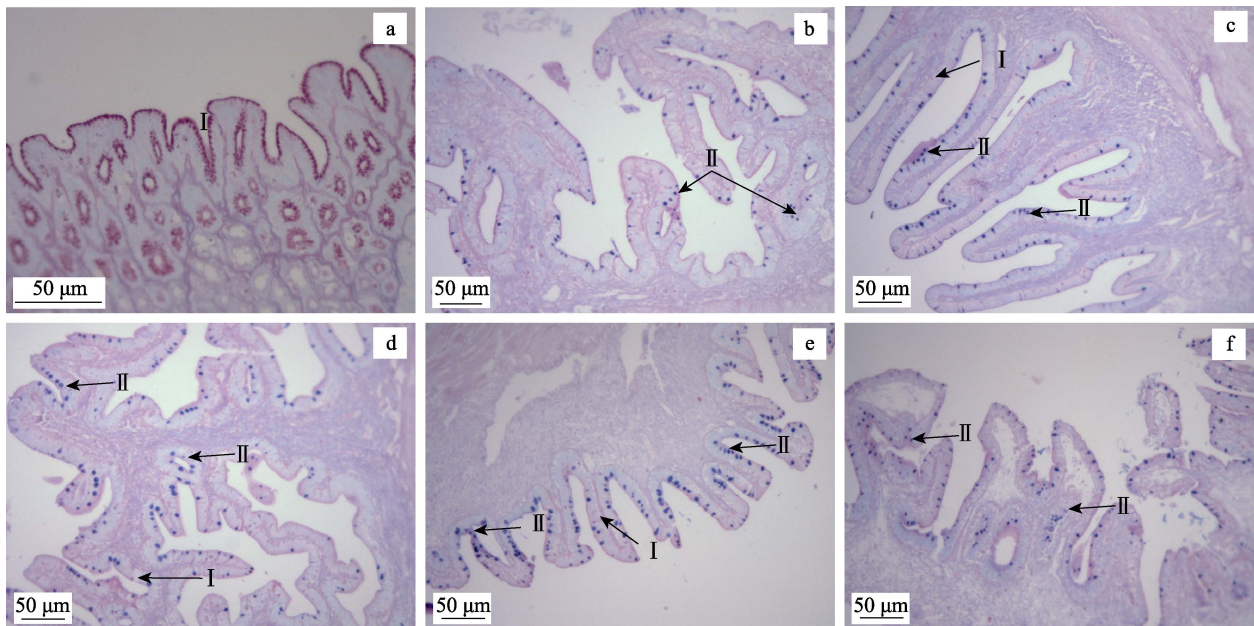


图 2 黄唇鱼消化道黏液细胞分布特征

Fig.2 Distribution of mucous cell in digestive tract of *B. flavolabiata*

a: 胃黏膜, 200×; b: 幽门盲囊, 100×; c: 中肠黏膜, 100×; d: 前肠黏膜, 100×; e, f: 后肠黏膜, 100×;

I: I 型黏液细胞; II: II 型黏液细胞

a: Mucosa in stomach, 200×; b: Pyloric caeca, 100×; c: Mucosa in midgut, 100×; d: Mucosa in foregut, 100×;

e and f: Mucosa in hindgut, 100×; I: Type I mucous cell; II: Type II mucous cell

3 讨论

3.1 黄唇鱼消化系统形态结构与食性的关系

鱼类消化道的形态结构随不同种属、不同食性及不同的生活环境等因素各不相同。研究表明,肉食性鱼的肠道一般呈直线型(曾瑞等, 1998)。黄唇鱼为近海暖温性稀有底层鱼类,为肉食性鱼类,主要摄食对象为鱼虾类。其口咽腔内具有锋利坚硬的颌齿和白齿,以便于捕食和磨嚼甲壳类等坚硬的食物;食道较粗短;胃部膨大;具有幽门盲囊;肠道较短,这些都是肉食性鱼类消化道的典型特点,与大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)(崔龙波等, 2014)、黄鳍鲷(*Sparus latus*)(王永翠等, 2012)和平鲷(*Rhabdosargus sarba*)(勾效伟等, 2008)等鱼类的研究结果相似,而与杂食性和草食性鱼类的结构不同。黄唇鱼胃部发达呈“卜”型,发达的胃部有利于容纳更多的食物,增长食物停留时间,有利于消化。胃部的外形存在种属间的差异,可分为I型、U型、V型、Y型和卜型5类,如波纹唇鱼(*Cheilinus undulates*)胃部呈“I”型(区又君等, 2012);黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)胃部呈“U”型(董婧等, 2014);黄斑篮子鱼(*Siganus oramin*)胃部呈“V”型(区又君等, 2013);而驼背鲈(*Cromileptes altinelis*)(区又君等, 2011)、平鲷(*Rhabdosargus sarba*)(勾效伟等, 2008)和四指马鲛(*Eleutheronema tetradactylum*)胃部外形呈“卜”型(谢木娇等, 2016),则与黄唇鱼相似。胃形状的不同影响胃容量以及食物的停留时间的长短,反映不同物种进化的差异,与其捕食习惯和栖息环境相联系。黄唇鱼的胃部发达,符合肉食性鱼类消化道的外形特征。黄唇鱼的肠呈直管状,肠壁上皮有许多皱襞,即肠绒毛,表面的纹状缘很发达,这样增大了消化吸收的面积,有利于食物的分解和营养物质的充分吸收。从前肠至后肠微绒毛数量逐渐减少,绒毛的宽度和高度逐渐减小,这与肠管的粗细和吸收性质有关。

3.2 黄唇鱼消化系统组织结构与功能的联系

黄唇鱼食道短而粗,其主要功能是容纳和输送摄取食物,并将食物输送到胃。食道黏膜具有很多纵行黏膜褶,当吞食较大食物时可用以扩大食道容量,以便于食物顺利地通过食道。食道肌肉层发达与其肉食性相适应。黄唇鱼胃部膨大发达,是完成蛋白质消化的场所。黄唇鱼的胃部黏膜层很厚,黏膜皱褶数量多且面积广,胃底部分布密集的胃腺,黏膜面积广大,增大了食物与胃的接触面积,胃腺分泌的黏液和胃蛋白酶源,更有利于消化肉食性食物,这与哲罗鱼(*Hucho taimen*)(关海红等, 2008)和黄尾鲷(*Seriola lalandi*)

(Chen, *et al*, 2006)的研究相似,而与金点鲷(*Liza parsia*)(Chakrabarti *et al*, 2014)胃部无胃腺的特点不同。肠道和幽门盲囊组织结构相似,黏膜皱褶比较长,而黏膜层也比较厚,前肠、中肠和后肠的黏膜褶数量保持相对稳定。黏膜褶可以帮助肠道扩大消化吸收面积,黏膜褶上有大量的杯状细胞,杯状细胞的功能是分泌黏液和消化酶类物质,从而加速对营养物质的消化和吸收。肝胰腺是鱼体内最大的消化腺,具有分泌、储存和排泄等功能,胰腺中合成和分泌大量的酶(淀粉酶、脂酶和胰蛋白酶等),协助食物的消化吸收(谢木娇等, 2017)。

3.3 黄唇鱼消化道黏液细胞分布特征

黏液细胞能分泌黏液和消化酶,可以起润滑作用,也可以与消化酶一起作用帮助消化。研究发现,其分泌物含有多种有机物质,如粘多糖、水解酶和免疫球蛋白等,在消化吸收和抵御病原体的侵害等方面也起到很大作用(McGuckin *et al*, 2011)。在消化道不同的部位,黏液细胞的种类及数量分布不同。黄唇鱼胃部分布有大量中性粘多糖的I型黏液细胞,这些中性黏液物质可在黏膜表面形成一层黏液膜,不容易被酸液破坏,可以保护胃部黏膜上皮免受盐酸和胃酶的侵蚀。黄唇鱼肠道和幽门盲囊的黏液细胞种类以II型黏液细胞为主,并有少量I型黏液细胞分布,尚未见含有中性酸性混合黏多糖的III型和IV型黏液细胞,这与四指马鲛(谢木娇等, 2015)、卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)(区又君等, 2012)肠道内黏液细胞数量密集种类丰富(含I、II、III、IV型黏液细胞)的特点不同。II型黏液细胞分泌的酸性黏液物质有润滑食物利于吞咽的作用,同时还与蛋白酶原的分泌有关,可以和蛋白酶合成复合物,起到稳定酶的作用。研究表明,I型和II型为幼稚型黏液细胞,III型和IV型为成熟型黏液细胞,黏液细胞的类型变化与发育过程是相一致的,由幼稚型逐渐向成熟型发展(李鑫炜等, 2012)。本研究在黄唇鱼样品的消化道中未发现成熟型黏液细胞,可能是由于样品为幼鱼,其消化道发育尚不完全,但有关黄唇鱼黏液细胞的发育研究有待进一步验证和探讨。从目前观察的结果来看,黄唇鱼消化道中的黏液细胞分布还没有找到确定的规律性,黏液细胞的分布特征与其栖息环境、生活阶段以及生理功能密切相关,尚待进一步研究。

参 考 文 献

Chakrabarti P, Ghosh SK. A comparative study of the histology and microanatomy of the stomach in *Mystus vittatus* (Bloch),

- Liza parsia* (Hamilton) and *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 2014, 2(4): 245–250
- Chen BN, Qin JG, Kumar MS, et al. Ontogenetic development of the digestive system in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture*, 2006, 256(1–4): 489–501
- Chen MY, Zhang XM. Development of digestive system in larval, juvenile and young turbot *Scophthalmus maximus*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, 30(2): 236–240 [陈慕雁, 张秀梅. 大菱鲆仔稚幼鱼消化系统发育的组织学研究. *水生生物学报*, 2006, 30(2): 236–240]
- Cui LB, Chi S, Li XH, et al. Histological and histological study of the digestive system of *Pseudosciaena crocea*. *Journal of Yantai University (Natural Science and Engineering Edition)*. 2014(4): 266–270 [崔龙波, 迟爽, 李新华, 等. 大黄鱼消化系统的组织学和组织化学研究. *烟台大学学报(自然科学与工程版)*, 2014(4): 266–270]
- Dong J, Liu C, Wu GF, et al. Morphological and histological studies in the digestive tract of *Pelteobagrus fulvidraco*. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2014(23): 4–6 [董婧, 刘聪, 吴高峰, 等. 黄颡鱼消化道形态与组织学研究. *黑龙江畜牧兽医*, 2014(23): 4–6]
- Gou XW, Ou YJ, Liao R. Histological and histochemical study of digestive system of *Rhabdosargus sarba*. *South China Fisheries Science*, 2008, 4(5): 28–36 [勾效伟, 区又君, 廖锐. 平鲷消化系统形态学、组织学及组织化学研究. *南方水产*, 2008, 4(5): 28–36]
- Guan HH, Kuang YY, Xu W, et al. Morphological and histological observations of the digestive system in *Hucho taimen*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, 15(5): 873–879 [关海红, 匡友谊, 徐伟, 等. 哲罗鱼消化系统形态学和组织学观察. *中国水产科学*, 2008, 15(5): 873–879]
- Li XW, Luo J, Li WP, et al. Types and distribution of mucous cells in larval and juvenile digestive tract of *Epinephelus malabaricus* (Bloch & Schneider). *Progress In Fishery Sciences*, 2012, 33(5): 15–23 [李鑫炜, 骆剑, 李伟萍, 等. 点带石斑鱼仔稚鱼消化系统黏液细胞的类型与分布. *渔业科学进展*, 2012, 33(5): 15–23]
- Lin XZ, Wang PF, Ou YJ, et al. An immunohistochemical study on endocrine cells in the neuroendocrine system of the digestive tract of milkfish *Chanos chanos*. *Aquaculture Research*, 2016, 1–11
- McGuckin MA, Lindén SK, Sutton P, et al. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(4): 265–278
- Ou YJ, Gou XW, Li JE. Histological and histochemical studies on digestive system of *Cromileptes altivelis*. *Marine Fisheries*. 2011; 33(3): 289–96 [区又君, 勾效伟, 李加儿. 驼背鲈消化系统组织学与组织化学研究. *海洋渔业*, 2011a, 33(3): 289–296]
- Ou YJ, Li JE, Gou XW. Morphological, histological, and histochemical observation of digestive tract in ovate pompano *Trachinotus ovatus*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2012, 27(1): 38–43 [区又君, 李加儿, 勾效伟. 卵形鲳鲹消化道的形态学、组织学和组织化学. *大连海洋大学学报*, 2012a, 27(1): 38–43]
- Ou YJ, Liao GY, Li JE. Morphology and histology of the digestive tract in *Cheilinus undulatus*. *Journal of Tropical Oceanography*, 2012, 31(6): 83–89 [区又君, 廖光勇, 李加儿. 波纹唇鱼消化道的形态学和组织学. *热带海洋学报*, 2012b, 31(6): 83–89]
- Ou YJ, Liao R, Li JE, et al. Application of otolith morphology in species discrimination for *Bahaba flavolabiata*, *Pseudosciaena crocea*, *wak tingi* and *Collichthys lucidus*. *Guangdong Agricultural Science*, 2012, 39(24): 143–147 [区又君, 廖锐, 李加儿, 等. 耳石形态在黄唇鱼、大黄鱼、丁氏鲷和棘头梅童鱼种类识别中的应用. *广东农业科学*, 2012c, 39(24): 143–147]
- Ou YJ, Liao R, Li JE, et al. Studies on the spawning period and growth of young *Bahaba flavolabiata* in estuary of Pearl River by otolith determination. *Ecological Science*, 2014, 33(2): 209–212 [区又君, 廖锐, 李加儿, 等. 采用耳石日轮研究珠江口黄唇鱼幼鱼的产卵期及生长. *生态科学*, 2014, 33(2): 209–212]
- Ou YJ, Liao R, Li JE, et al. The analysis and evaluation of nutrition composition in muscle and air bladder of wild *Bahaba flavolabiata*. *Acta Oceanologica Sinica*, 2010, 32(3): 113–120 [区又君, 廖锐, 李加儿, 等. 野生黄唇鱼 *Bahaba flavolabiata* 肌肉和鳔营养成分的分析与评价. *海洋学报*, 2010, 32(3): 113–120]
- Ou YJ, Liao R, Li JE, et al. The morphology of otolith and its characteristics of microstructure in *Bahaba flavolabiata*. *Guangdong Agricultural Science*, 2011, 38(12): 123–124 [区又君, 廖锐, 李加儿, 等. 黄唇鱼的耳石形态和微结构特征. *广东农业科学*, 2011, 38(12): 123–124]
- Wang YC, Li JE, Ou YJ, et al. Morphological and histological study on the digestive tract of wild and cultivated yellowfin black porgy (*Sparus latus*). *Chinese Journal of Zoology*, 2012, 47(3): 9–19 [王永翠, 李加儿, 区又君, 等. 野生与养殖黄鳍鲷消化道形态组织结构. *动物学杂志*, 2012, 47(3): 9–19]
- Wang YC, Li JE, Ou YJ, et al. Types and distribution of mucous cells in digestive tracts of wild and cultivated yellowfin black porgy (*Sparus latus*). *South China Fisheries Science*. 2012, 8(5): 46–51 [王永翠, 李加儿, 区又君, 等. 野生与养殖黄鳍鲷消化道中黏液细胞的类型及分布. *南方水产科学*, 2012, 8(5): 46–51]
- Xie MJ, Ou YJ, Li JE, et al. Histological observation of the post-embryonic development of digestive tract of *eleutheronema tetradactylum*. *Progress In Fishery Sciences*, 2017, 38(2): 50–58 [谢木娇, 区又君, 李加儿, 等. 四指马鲛 (*Eleutheronema tetradactylum*) 消化系统胚后发育组织学观察. *渔业科学进展*, 2017, 38(2): 50–58]
- Xie MJ, Ou YJ, Li JE, et al. A comparative histochemical study

- on mucous cells in digestive tract of *Eleutheronema tetradactylum* with juvenile, young and adult fish. Chinese Journal of Cell Biology, 2015, 37(9): 1226–1234 [谢木娇, 区又君, 李加儿, 等. 四指马鲛稚鱼、幼鱼和成鱼消化道黏液细胞组织化学研究. 中国细胞生物学学报, 2015, 37(9): 1226–1234]
- Xie MJ, Ou YJ, Li JE, et al. Histology observation in digestive tract of *Eleutheronema tetradactylum* at different developmental stages. South China Fisheries Science, 2016, 12(2): 51–58 [谢木娇, 区又君, 李加儿, 等. 不同发育阶段的四指马鲛消化道组织学比较研究. 南方水产科学, 2016, 12(2): 51–58]
- Zeng R, Ye YT. Studies on digestive system and different feeding habits of some fishes in freshwater. Journal of Southwest Agricultural University, 1998, 20(4): 361–364 [曾端, 叶元土. 鱼类食性与消化系统结构的研究. 西南农业大学学报, 1998, 20(4): 361–364]
- Zhong JS. *Bahaba flavolabiata*. The freshwater fishes of Guangdong Province, 1991, 380–381 [钟俊生. 黄唇鱼. 广东淡水鱼类志, 1991, 380–381]

(编辑 江润林)

Histology and Distribution of Mucous Cells in Digestive System of *Bahaba flavolabiata*

ZHAO Yanhua^{1,2}, OU Youjun¹Ⓐ, LI Jiaer¹, WEN Jiufu¹, ZHOU Hui^{1,2}

(1. Key Laboratory for Exploitation & Utilization of Marine Fisheries Resource in South China Sea, Ministry of Agriculture, and Rural Affairs South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract This work aimed to investigate the histological structure and mucous cell distributing features in the digestive system of *Bahaba flavolabiata*. Conventional paraffin sections were used, with H&E and AB-PAS (Alcian blue and periodic acid Schiff reagent (AB, pH 2.5)) staining. The esophagus was crude and short, and the Bu-type stomach was divided into three portions: the cardiac stomach, fundic stomach, and pyloric stomach. There were eight pyloric caeca, and the intestine had two inflections in the body cavity. The histological analysis revealed that the digestive tract wall was composed of serosa, muscularis, submucosa, and mucosa, from the outer wall inwards. The muscularis of the esophagus was thick, but the mucosa was thin, and the epithelium did not have mucous. Muscularis and mucosa of the stomach were thick and composed of simple columnar epithelium, with a gastric gland found in the lamina propria. The pyloric caeca were characterized as having large cavity diameters, and numerous mucosa folds, with very thin muscularis layers. The muscularis in the intestine was thicker than that in the pyloric caeca, with numerous mucosa folds. Here, mucous cells were found in the epithelium. AB-PAS staining revealed that only type I and type II mucous cells were present in the entire digestive tract of *B. flavolabiata*, except in the esophagus. Numerous type I mucous cells were found in the gastric gland and epithelium of the stomach. Only type II mucous cells were found distributed in the epithelium of pyloric caeca mucosa. A large number of type II and a smaller number of type I mucous cells were found in the intestine. The former were distributed mostly on the surface of the epithelium and the latter in the basal layer of the epithelium. Characteristics of the histological structure and mucous cell distribution in digestive systems are in accordance with the habits and predacity of *B. flavolabiata*.

Key words *Bahaba flavolabiata*; Digestive system; Mucous cell

Ⓐ Corresponding author: OU Youjun, E-mail: ouyoujun@126.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171226001

http://www.yykxjz.cn/

谢志胜, 马江霞, 杨昆明, 段成任, 郭爱民, 岳城. 图丽鱼寄生破坏古氏虫的形态描述及系统发育. 渔业科学进展, 2019, 40(3): 87-93

Xie ZH, Ma JX, Yang KM, Duan CR, Guo AM, Yue C. Morphological description and molecular phylogeny of the *Gussevia asota* parasite on *Astronotus ocellatus*. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(3): 87-93

图丽鱼寄生破坏古氏虫的形态描述及系统发育*

谢志胜 马江霞 杨昆明 段成任 郭爱民 岳城^①

(新疆农业大学动物医学学院 乌鲁木齐 830052)



摘要 在调查新疆乌鲁木齐市观赏鱼感染寄生虫种类期间,从图丽鱼(*Astronotus ocellatus*)鳃部采集到一种单殖吸虫,经过形态学比较具有鉴定依据的背腹中央大钩、联接片、交接器等结构后,鉴定为锚首虫亚科(Ancyrocephalinae)的破坏古氏虫(*Gussevia asota*)。首次测定了破坏古氏虫 28S rDNA 基因序列(GenBank 登录号: MG596661),系统发育分析表明,该虫与鲮鱼虫属(*Ligophorus*)、嗜丽鱼虫属(*Cichlidogyrus*)的亲缘关系较近,聚为稳定的独立分支。

关键词 图丽鱼; 破坏古氏虫; 形态描述; 系统发育

中图分类号 S941.5 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2019)03-0087-07

图丽鱼(*Astronotus ocellatus*)别名“地图鱼”、“猪仔鱼”等,是一种原产于秘鲁、哥伦比亚和巴西亚马逊流域和法属圭亚那、阿根廷一带的热带淡水、底栖性鱼类(鲈形目 Perciformes、慈鲷科 Cichlidae);作为一个引进的物种也存在于巴西流域盆地(De Azevedo *et al.*, 2007)。对水族爱好者来说,它是一种非常受欢迎的商业性慈鲷科鱼类,同时,也因其鲜美的肉质而被亚马逊流域的人作为一种食用鱼(Delgado *et al.*, 2014; Tavares-Dias *et al.*, 2014)。近年来,随着“一带一路”经济带的建设,新疆地区的水产养殖发展迅速,但在发展的过程中,也出现一些疾病问题,如寄生虫就是严重危害当地养殖鱼类的重要病原之一。

古氏虫属(*Gussevia*)(Kohn *et al.*, 1964)隶属于锚首虫亚科(Ancyrocephalinae),其中,包括 17 种有效物种,这些单殖吸虫通常寄生于慈鲷科鱼类的鳃部(Thatcher, 1991)。Lubomír Šmiga 等(2016)研究发现,当大量的虫体寄生于鱼体时,鱼表现出明显的窒息,神经系统症状(狂游、碰壁等),运动失调和突然死亡。

长期以来,单殖吸虫的鉴定主要是依靠其具有鉴定意义的几丁质结构的形态进行,但是,由于单殖吸虫种类繁多,且形态极为相近,这就为虫种的正确鉴定带来一定的困难。近年来,随着分子标记技术的迅速发展,基因组序列测定已逐步成为物种分子系统发育学研究的普遍方法,尤其是核糖体基因,在寄生虫物种鉴定、亲缘关系的演化等方面尤为突出(孟飞燕, 2016; Mollaret *et al.*, 2000; 丁雪娟等, 2005)。本研究通过测定破坏古氏虫的 28S rDNA 的序列,旨在为该虫在分子系统进化方面提供基础资料,同时,也填补了该虫在分子生物学研究方面的空白。

1 材料与方法

1.1 样品的来源

2016年5月~2017年6月,对新疆乌鲁木齐明珠花卉市场和华凌观赏鱼市场养殖观赏鱼做寄生虫学调查期间,先后采集到图丽鱼 18 尾。将活鱼运送到实验

* 国家自然科学基金(31360644)和科技成果转化专项资金(2016C03013)共同资助 [This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31360644), and Scientific and Technological Achievements Transformation Special Funds (2016C03013)]. 谢志胜, E-mail: 1127090984@qq.com

^① 通讯作者: 岳城, 教授, E-mail: yuechengxd@aliyun.com

收稿日期: 2017-12-26, 收修改稿日期: 2018-04-02

室并进行拍照、测量和称重,并使用常规解剖法将鱼处死后,对其进行寄生虫学检查,分别剪取每条鱼的鳃片,在解剖镜下逐一检查,发现寄生虫后,用吸管吸取得到 1.5 ml 的 EP 管中,滴加不同浓度的乙醇保存。

1.2 形态学鉴定

在解剖镜下挑取形态完整的虫体放置在载玻片上,用 4% 聚乙烯乳酸酚(伍惠生, 1980)固定封片,并在光学显微镜下拍照,测定背腹中央大钩、联接片、交接器等几丁质结构,小括号前的数值为所测量标本的平均值,括号中为量度变化范围。所制虫体标本保存在新疆农业大学动物医学学院寄生虫实验室。

1.3 DNA 提取及目的基因的 PCR 扩增

依据形态学鉴定结果,选取 95% 乙醇保存的虫体若干只,清水冲洗,TE 缓冲液浸泡过夜后,分别装入 1.5 ml 的 EP 管中,用 DNA 提取试剂盒提取虫体 DNA,保存于 -20℃ 冰箱中,用于后续实验。

分子标记选取核糖体 DNA 的 28S rDNA 序列,目的序列的扩增引物参照 Hassouna 等(1984),引物序列为 MF1: 5'-ATTCCGATAACGAACGAGACT-3', MR1: 5'-GCTAGCTGCGTTCTTCATCGA-3'。PCR 扩增的反应体系为 50 μ l,反应程序: 95℃ 4 min; 92℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min 30 s, 35 个循环; 72℃ 10 min, 4℃ 终止。

1.4 目的 DNA 序列的测定

将扩增产物经 1% 的琼脂糖电泳分析,切取目的条带,用全式金胶回收试剂盒纯化后,送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.5 基于 28S rDNA 序列的系统发育分析

基于 28S rDNA 序列,以 *Gyrodactylus pterygialis* 为外类群,选取 20 种(表 1)已发表的分属于锚首虫亚科不同属之间的 28S rDNA 序列,与本研究所测得的序列一起,在 MEGA 7.0 软件中构建系统发育树。

表 1 本实验用到的已发表的锚首虫亚科 28S rDNA 序列信息
Tab.1 List of published Ancyrocephalinae 28S rDNA sequences used in this study

属 Genus	拉丁名 Latin name	GenBank 登录号 GenBank accession number
鲮鱼虫属 <i>Ligophorus</i>	<i>L. uruguayensis</i>	KF442630
	<i>L. chabaudi</i>	JN996834
	<i>L. cephalis</i>	JN996830
嗜丽鱼虫属 <i>Cichlidogyrus</i>	<i>C. casuarinus</i>	KX007822
	<i>C. amieti</i>	KT945076
	<i>C. yanni</i>	HE792777
	<i>P. gigi</i>	KX812456
伪锚盘虫属 <i>Pseudancylo-discoides</i>	<i>Pseudancylo-discoides</i> sp.	EF100544
	<i>Q. kobiensis</i>	EF100545
四刺虫属 <i>Quadriacanthus</i>	<i>Q. clariadis</i>	KX685952
	<i>Q. bagrae</i>	KX685951
	<i>A. percae</i>	KF499080
锚首虫属 <i>Ancyrocephalus</i>	<i>A. percae</i>	KF499080
	<i>A. paradoxus</i>	AJ969952
	<i>H. cromileptis</i>	EU523146
海盘虫属 <i>Haliotrema</i>	<i>H. johnstoni</i>	DQ157664
	<i>H. platycephali</i>	DQ157662
	<i>C. pricei</i>	AJ969939
锁盘虫属 <i>Cleidodiscus</i>	<i>B. rosetta</i>	DQ537364
嗜石鲈虫属 <i>Bravohollisia</i>	<i>T. asoti</i>	MG601546
撒氏虫属 <i>Thaparocleidus</i>		

2 结果

2.1 形态学鉴定结果

在对图丽鱼进行寄生虫学检查时,除了检查鳃丝外,还检查了其他内部的脏器组织和体表皮肤,但并没有发现其他的病原体存在。而在鳃片的检查过程中发现,该寄生虫偏好寄生在鳃丝顶端末梢,且感染率

和感染强度非常高,分别达到 92% 和 1~224。

基于被测量的 8 个虫体玻片标本,虫体全长为 441.6 (307.7~530.8) μ m,纺锤形,头区狭窄。头腺非常发达,4 对,分别在头区顶部两端。眼点 2 对,等距,后一对较大。最大体宽为 82.3 (50.8~96.4) μ m。咽为卵圆形,直径为 21.9 (19.8~25.1) μ m。后吸器发育完全,分为发达的前叶和后叶,前叶大于后叶的腺

体斑块, 后吸器宽为 $64.3 (50.9\sim79.8) \mu\text{m}$ 。腹中央大钩全长为 $20.5 (15.7\sim22.9) \mu\text{m}$, 钩基长为 $18.2 (12.2\sim20.8) \mu\text{m}$, 钩尖长为 $8.7 (8.0\sim10.3) \mu\text{m}$, 具有发达的几丁质丝, 内外突分化不明显, 内突长为 $5.7 (3.5\sim9.8) \mu\text{m}$, 外突长为 $3.4 (3.1\sim3.7) \mu\text{m}$ 。背中央大钩全长为 $25.4 (24.4\sim26.8) \mu\text{m}$, 钩基长为 $21.4 (20.6\sim24.4) \mu\text{m}$, 钩尖长为 $15.9 (14.3\sim17.4) \mu\text{m}$, 内外突分化明显, 内突长为 $10.2 (8.7\sim12.0) \mu\text{m}$, 外突长为 $4.6 (4.3\sim4.9) \mu\text{m}$ 。腹联接片大小为 $1.9\times27.4 [(1.2\sim2.6)\times(21.5\sim30.9)] \mu\text{m}$, 细丝状, 末端卷曲在腹中央大钩基部。背联接片大小为 $3.8\times37.5 [(2.6\sim5.7)\times(24.5\sim44.1)] \mu\text{m}$, 棒状, 末端稍扩大。边缘小钩 7 对, 第 1~4 对和第 6、7 对边缘小钩为锥形钩, 长为 $10.7 \mu\text{m} (N=2)$, 第 5 对边缘小钩长为 $12.2 \mu\text{m} (N=2)$ 。交接器由交接管和支持器 2 部分组成, 交接管卷曲, 基部膨大, 长为 $52.2 (47.9\sim56.4) \mu\text{m}$ 。支持器与交接管基部相连, 末端扇形片具有 1 个几丁质结构的环, 长为 $29.8 (28.8\sim30.8) \mu\text{m}$ 。阴道右旋, 外部具有硬化的保护结构。虫体前端有散在的虫卵分布, 大小为 $2.1\times1.1 [(1.4\sim2.7)\times(0.7\sim1.6)] \mu\text{m}$ 。

根据玻片标本图, 测量虫体各结构, 通过与各国已报到破坏古氏虫的测量数值进行比对(表 2)发现, 部分数值大于或者小于其他测量值。根据 Kritsky 等(1989b)和 Abdallah 等(2008)研究表明, 寄生虫的鉴定是基于后吸器几丁质结构(背腹中央大钩、联接片和边缘小钩)的形状和交配器。本研究发现, 虫体的交接器、后吸器的结构(图 1)与 Kritsky 等(1989b)(图 2)所描述的原始种虫体的形态结构略有差异。而中国广东地区发现分离的虫体后吸器分叶不明显, 且头区较宽, 虫体并不呈纺锤形, 且腹中央大钩的基本形态与本研究 and 国外报道的有一定差异。

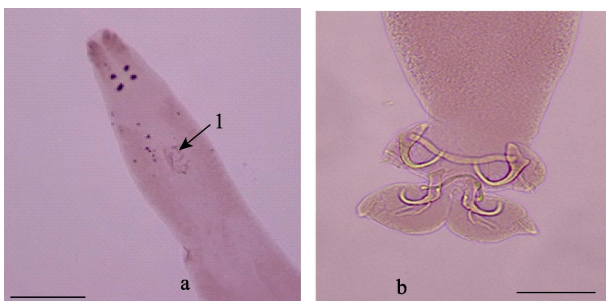


图 1 破坏古氏虫交接器和后固着器的形态

Fig.1 The morphological features of copulatory organ and haptor of *G. asota*

a: 破坏古氏虫前端; b: 破坏古氏虫后端(后吸器);
1: 交接器; 比例尺=50 μm

a: Anterior region of *G. asota*; b: Posterior region of *G. asota* (Haptor); 1: Copulatory organ; Scale bar=50 μm

在本研究中, 增加了腹、背中央锚钩的参数测量, 这些参数特征在原始种中没有表现出来。通过比对发现, 本研究虫体的体长与原始种和广东地区分离的虫体体长最为接近, 而秘鲁发现的虫体体长最大。体宽、后吸器宽与原始种最为接近。对比腹、背中央大钩长发现, 其测量值均小于已报到虫体。而背联接片的测量参数大于其他虫体。

2.2 28S rDNA 基因序列分析

根据形态学鉴定结果, 测定虫体的 28S rDNA 基因序列。此外, 经文献检索尚无学者对古氏虫属的虫体做分子生物学方面的研究分析。本研究首次测定了破坏古氏虫的 28S rDNA 片段, 其目的条带为 864 bp, G+C 含量为 48.4%。将已获得的序列在 NCBI 中 BLAST 比对分析发现, 该序列与嗜丽鱼虫属(*Cichlidogyrus*)、鲮鱼虫属(*Ligophorus*)物种的同源性最高, 达 90%。将获得的序列上传至 GenBank, 获得 GenBank 序列收录号为 MG596661。

选取锚首虫亚科不同属的序列绘制系统发育树分析表明, 该虫与鲮鱼虫属、嗜丽鱼虫属的虫体亲缘关系较近, 聚为稳定的独立分支。

3 讨论

古氏虫属至今为止共报道 17 种有效物种, 该属为鳃寄生虫, 通常寄生在热带慈鲷科鱼类鳃上。该属的虫体形态非常相近, 而后吸器的几丁质结构和交接器是区别该属虫体的主要形态学依据。图丽鱼所寄生的破坏古氏虫最早由 Kritsky 等(1989b)做过详尽的描述, 而破坏古氏虫是该属中最常见的种, 后来也在不同国家、不同地区的图丽鱼上报道过。但是, 通过直观的形态图比较发现, 在新疆采集到的破坏古氏虫与在欧洲斯洛伐克(Lubomír Šmiga *et al*, 2016)和巴西(Abdallah *et al*, 2008)采集到的虫种形态最为相似, 而巴拿马(Mendoza-Franco *et al*, 2010)、韩国(Kim *et al*, 2002)、秘鲁亚马逊发现的破坏古氏虫没有绘制模式图, 故无法进行直观的形态比较。而李海燕(2015)在中国广东地区采集的破坏古氏虫后吸器分叶不明显, 部分结构也略有不同, 也有可能与绘图或个人的测量操作有关。而关于虫体的测量数值, 各国的报道均有差异, 可能与采集季节、水域温度等外界条件和观察角度等有关。

近年来, 利用分子生物学技术研究单殖吸虫的报道日渐增多, 研究的靶基因以核糖体 RNA 基因(rDNA)及其内转录间隔区(ITS)为主(Hansen *et al*, 2003), 在通过对多种蠕虫的分析研究发现, 28S rDNA 基因 5'

表2 已报道图丽鱼寄生破坏古氏虫的形态比较(括号中为范围)(μm)
 Tab.2 Reported morphological comparison of *A. ocellatus* parasitic *G. asota* (The brackets indicate the range)(μm)

项目 Items	地区 Region						
	原始种 The original	巴拿马 Panama	斯洛伐克 Slovakia	巴西 Brazil	秘鲁 Peru	广州市 Guangzhou	新疆(本研究) Xinjiang (This study)
体长 Body length	394(380~462)	—	544(540~564)	523(510~540)	630	366(325~400)	441.6(307.7~530.8)
体宽 Greatest width	88(73~111)	—	92(81~121)	100(91~105)	103	75(70~80)	82.3(50.8~96.4)
咽直径 Pharynx width	25(21~30)	—	—	22(20~23)	23~29	25(22~27)	21.9(19.8~25.2)
后吸器宽 Haptor width	66(61~78)	—	105(102~111)	109(90~118)	160	69(60~75)	64.3(50.9~79.8)
腹中央大钩全长 Ventral anchor length	26(25~28)	25~26	26(24~29)	27(26~29)	25(24~27)	27(25~28)	20.5(15.7~22.9)
钩尖长 Point	—	—	—	—	—	12(11~13)	8.7(8.0~10.0)
钩基部长 Shaft	—	—	—	—	18	13(11~16)	18.2(12.2~20.8)
内突长 Inner root	—	—	—	—	—	—	5.7(3.5~9.8)
外突长 Outer root	—	—	—	—	—	—	3.4(3.1~3.7)
背中央大钩全长 Dorsal anchor length	27(24~30)	26	27(24~28)	28(26~30)	26(25~27)	23(20~25)	25.4(24.4~26.8)
钩尖长 Point	—	—	—	—	—	15(13~16)	15.9(14.3~17.4)
钩基部长 Shaft	—	—	—	—	12	14(13~16)	21.4(20.6~24.4)
内突长 Inner root	—	—	—	—	—	6(5~7)	10.2(8.7~12.0)
外突长 Outer root	—	—	—	—	—	2	4.6(4.3~4.9)
腹联接片长 Ventral bar length	31(24~35)	30	26~35	31~32	32(30~33)	29(26~32)	27.4(21.5~30.9)
背联接片长 Dorsal bar length	31(23~36)	28	23~36	34(33~35)	33(31~38)	30(26~34)	37.5(24.5~44.1)
第1~4、6~7对边缘小钩 Hooks pairs 1~4, 6~7	11(10~12)	10~11	—	11~12	11(10~12)	11(10~12)	10.7(9.7~10.9)
第5对边缘小钩 Hooks pairs 5	14(13~15)	—	—	13(12~14)	15(14~15)	—	12.2
交接管 Copulatory tube	61~62	16	54~73	52(49~54)	30(28~35)	56(47~60)	52.2(47.9~56.4)
支持器 Accessory piece	27(23~29)	31	—	33(32~35)	21(26~31)	42(38~45)	29.8(28.8~30.8)

注：“—”为无原始数据

Note: “—” represents no original data

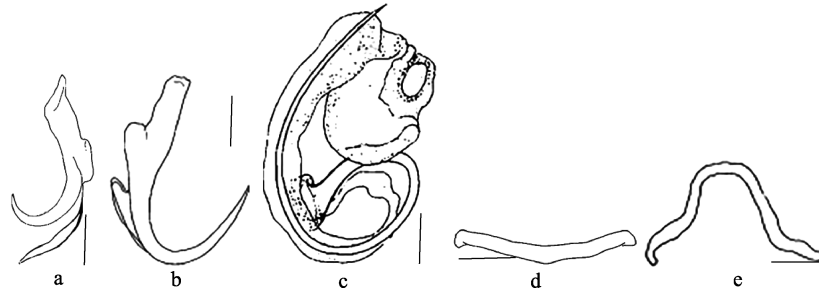


图 2 原始描述中关于破坏古氏虫的部分几丁质结构

Fig.2 The sclerotized hard parts of *G. asota* in the original description (Kritsky, 1989b)

a: 腹中央大钩; b: 背中央大钩; c: 交接器; d: 背联接片; e: 腹联接片。比例尺=30 μm
a: Ventral anchor; b: Dorsal anchor; c: Copulatory organ; d: Ventral bar; e: Dorsal bar. Scale bar=30 μm

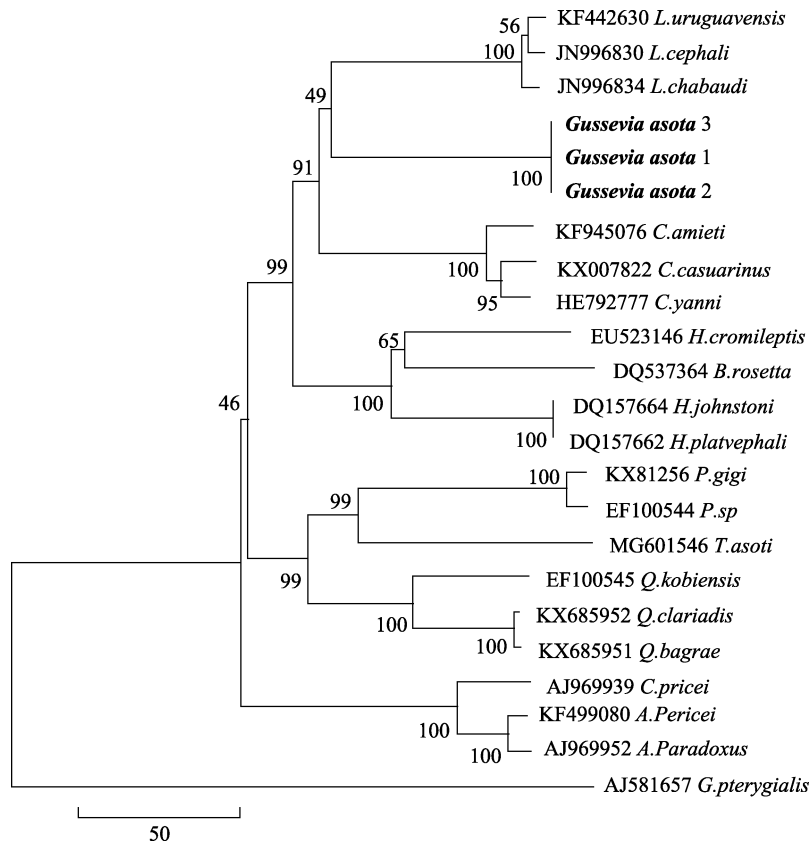


图 3 基于 28S rDNA 序列构建的图丽鱼寄生破坏古氏虫邻接法(NJ)系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of *A. ocellatus* parasitic *G. asota* based on 28S rDNA sequences using Neighbour-Joining method

端包括 D1 可变区适合于推断种间、属间及近缘科间的关系(Qu *et al*, 1988; Barker *et al*, 1996)。鉴于 GenBank 中尚未有关于古氏虫的相关分子序列, 为此选用国际单殖吸虫界采用较多的 28S rDNA 基因序列, 首次测定了古氏虫的 28S rDNA 序列, 研究结果显示, 古氏虫属与鲮鱼虫属和嗜丽鱼虫属关系最近, 三者互为姐妹群, 与上述三属关系最近的是海盘虫属与嗜石鲈虫属, 这五属构成一支; 与伪锚盘虫属、四

刺虫属、锚首虫属、撒氏虫属和锁盘虫属构成的另一支互为姐妹群。而这一结果与 Mendoza-Palmero 等(2015)的研究结果略有不同, 可能与系统发育树制作方法、虫种序列选择、宿主及环境等有关。由于锚首虫亚科及其所属的地位自建立以来一直备受争论(Gusev, 1961), 而 Mendoza-Palmero 等(2015)研究表明, 锚首虫亚科目前的分类是人为的, 并不能反映这个物种极其多样化的单殖吸虫组成的系统发育关系。在

Lim(2001)等对寄生于鲈形目鱼类单殖吸虫的分类地位进一步修订后,提议将锚盘虫亚科提升到科水平以容纳 17 属,而 Kritsky 等(1989a)运用分子的手段得出,锚首虫科在系统发育中的位置是存在问题,因此有必要对其进行修订,而这也是一个开放的问题。

参 考 文 献

- Abdallah VD, Azevedo RK, Luque JL. Notes on the morphology of two species of *Gussevía* Kohn & Paperna (Monogenea: Dactylogyridae) parasitic on *Astronotus ocellatus* (Agassiz) (Perciformes: Cichlidae) from Brazil. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 2008, 3(2): 101–104
- Barker SC, Blair D. Molecular phylogeny of *Schistosoma* species supports traditional groupings within the genus. *Journal of Parasitology*, 1996, 82(2): 292–298
- De Azevedo RK, Abdallah VD, Luque JL. Community ecology of metazoan parasites of apaiari *Astronotus ocellatus* (Cope, 1872) (Perciformes: Cichlidae) from Guandu river, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 2007, 16(1): 15–20
- Delgado PM, Delgado JPM, Orbe RI. Parasitism by *Gussevía asota* in gills of juveniles of *Astronotus ocellatus* cultured in the Peruvian Amazon. *Journal of Fisheries Sciences*.com, 2014, 8(1): 61–66
- Ding XJ, Liao XH. Phylogenetic position of the monogeneans *Pseudodactylogyrus*, *Heteronchocleidus* and *Trianchoratus* inferred from the 5' terminal sequences of 28S rDNA. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 2005, 30(2): 244–251 [丁雪娟, 廖翔华. 伪指环虫、异钩虫和三钩虫的系统位置. *动物分类学报*, 2005, 30(2): 244–251]
- Gusev AV. New subfamily of monogeneans (Monogenoidea). *Dokl Akad Nauk SSSR*. 1961, 139: 1480–1482 (in Russian)
- Hansen H, Bachmann L, Bakke TA. Mitochondrial DNA variation of *Gyrodactylus* spp. (Monogenea, Gyrodactylidae) populations infecting Atlantic salmon, grayling, and rainbow trout in Norway and Sweden. *International Journal for Parasitology*, 2003, 33(13): 1471–1478
- Hassouna N, Michot B, Bachelier JP. The complete nucleotide sequence of mouse 28S rRNA gene. Implications for the process of size increase of the large subunit rRNA in higher eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, 1984, 12(8): 3563–3583
- Kim JH, Hayward CJ, Joh SJ, et al. Parasitic infections in live freshwater tropical fishes imported to Korea. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2002, 52(2): 169–173
- Kohn A, Paperna I. Monogenetic trematodes from aquarium fishes. *Revista Brasileira de Biologia*, 1964, 24(2): 145–149
- Kritsky DC, Boeger WA. The phylogenetic status of the Ancyrocephalidae Bychowsky, 1937 (Monogenea: Dactylogyroidea). *The Journal of Parasitology*, 1989a, 75(2): 207–211
- Kritsky DC, Thatcher VE, Boeger WA, et al. Neotropical Monogenea. 15. Dactylogyrids from the gills of Brazilian Cichlidae with proposal of *Sciadicleithrum* gen.n. (Dactylogyridae). *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 1989b, 56(2): 128–140
- Li HY. Description of three species of *Gussevía* Kohn & Paperna, 1964 (Monogenea, Ancyrocephalidae) from the gills of exotic fish *Astronotus ocellatus* in China. *Journal of South China Normal University (Natural Science Edition)*, 2015, 47(3): 107–111 [李海燕. 中国外来鱼类寄生古氏虫属(单殖吸虫, 锚首虫科)3 个种的描述. *华南师范大学学报(自然科学版)*, 2015, 47(3): 107–111]
- Lim LHS, Timofeeva TA, Gibson DI. Dactylogyridean monogeneans of the siluriform fishes of the Old World. *Systematic Parasitology*, 2001, 50(3): 159–197
- Lubomír Šmiga, Košuthová L, Koščo J, et al. First report of *Gussevía asota* (Monogenea: Dactylogyridae), destructive parasite of *Astronotus ocellatus* (Perciformes: Cichlidae) in Europe. *Biologia*, 2016, 71(5): 547–550
- Mendoza-Franco EF, Scholz T, Rozkošná P. *Tucunarella* n. Gen. and other dactylogyrids (Monogenoidea) from cichlid fish (Perciformes) from Peruvian Amazonia. *Journal of Parasitology*, 2010, 96(3): 491–498
- Mendoza-Palmero CA, Blasco-Costa I, Scholz T. Molecular phylogeny of Neotropical monogeneans (Platyhelminthes: Monogenea) from catfishes (Siluriformes). *Parasites and Vectors*, 2015, 8: 164
- Meng FY. Morphological taxonomy of monogeneans and molecular identification of Diplozoidae and Ancyrocephallidae parasitizing 10 host fishes from Lancang River, Jinghong Basin. Master's Thesis of Yunnan Normal University, 2016 [孟飞燕. 澜沧江景洪流域 10 种鱼类单殖吸虫的形态学分类及双身虫科和锚首虫科的分子鉴定. 云南师范大学硕士研究生学位论文, 2016]
- Mollaret I, Lim LHS, Justine JL. Phylogenetic position of the monogeneans *Sundanonchus*, *Thaparocleidus*, and *Cichlidogyrus* inferred from 28S rDNA sequences. *International Journal for Parasitology*, 2000, 30(5): 659–662
- Qu LH, Nicoloso M, Bachelier JP. Phylogenetic calibration of the 5' terminal domain of large rRNA achieved by determining twenty eucaryotic sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 1988, 28(1–2): 113–124
- Tavares-Dias M, Sousa TJSM, Neves LR. Parasitic infections in two benthopelagic fish from Amazon: The arowana *Osteoglossum bicirrhosum* (Osteoglossidae) and oscar *Astronotus ocellatus* (Cichlidae). *Bioscience Journal*, 2014, 30(2): 546–555
- Thatcher VE. Amazon fish parasites. *Amazoniana*, 1991, 11(3–4): 263–572

Wu HS. Polyvinyl alcohol method for sealing fish parasites and small arthropods. Chinese Journal of Zoology, 1980(1):

52-53 [伍惠生. 聚乙烯醇封固鱼类寄生虫和小型节肢动物的方法. 动物学杂志, 1980(1): 52-53]

(编辑 马瑾艳)

Morphological Description and Molecular Phylogeny of the *Gussevia asota* Parasite on *Astronotus ocellatus*

XIE Zhisheng, MA Jiangxia, YANG Kunming, DUAN Chengren, GUO Aimin, YUE Cheng^①

(College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052)

Abstract *Astronotus ocellatus* is a tropical, benthic freshwater fish that originated in South America and is a great favorite for a vast number of aquariums. With the development and extension of the “Belt and Road Initiative” Economic Zone, as an inland area of Xinjiang, the development of ornamental fish is particularly fast, but the rapid development is accompanied by a series of disease problems, such as common parasitic diseases, which are a common factor restricting the development of fisheries. The aim was to investigate the XinJiang common ornamental fish parasite epidemic and classification situation. This study combines the traditional morphological identification methods of parasites with modern molecular biology methods, researching the parasitic monogenean species of *A. ocellatus*, at the gill site. The subjects were common *A. ocellatus* selected from the Urumqi Ornamental fish market. From 2016 May to 2017 June, 18 fish samples were collected. The results of the experimental analysis showed that parasites on the gills of *A. ocellatus* were *Gussevia asota*, belonging to Dactylogyridae, Ancyrocephalinae, *Gussevia*. The morphological parameters of the parasite were measured and compared with all the morphological data previously reported on the parasite. It was found that there were certain differences between the data measured by different countries. By data retrieval, there is no sequence information of *Gussevia Asota* molecules in the GenBank database. Therefore, the *G. asota* 28S rDNA gene sequence was determined and submitted, obtaining GenBank sequence number: MG596661. Phylogenetic tree species from different genera of Ancyrocephalinae were analyzed. Phylogenetic analysis indicated that *G. asota* was at the top of the phylogenetic tree, with *Ligophorus* having the closest relationship, and together forming a sister group. And then get together with the parasites of the *Cichlidogyrus*, as a large branch, the kinship with *Ancyrocephalus* and *Cleidodiscus* is the furthest.

Key words *Astronotus ocellatus*; *Gussevia asota*; Morphological description; Phylogenetic

① Corresponding author: YUE Cheng, E-mail: yuechengxnd@aliyun.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171226002

http://www.yykxjz.cn/

高海钰, 李健, 王佳佳, 李吉涛. 十足目甲壳动物的 EST-SSR 分析. 渔业科学进展, 2019, 40(3): 94-102

Gao HY, Li J, Wang JJ, Li JT. Analysis of SSR information in EST resource of decapod crustaceans. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(3): 94-102

十足目甲壳动物的 EST-SSR 分析*



高海钰^{1,2,3} 李健^{1,2,3}① 王佳佳^{2,3} 李吉涛^{2,3}

(1. 上海海洋大学 上海 201306; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食品产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 本研究应用生物信息学方法,对 21 种十足目甲壳动物 EST-SSR 的特点进行了归纳总结和分析。结果显示,不同物种间的 EST-SSR 丰度存在明显差异,腹胚亚目中脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)的 EST-SSR 位点最为丰富(868.02 个/Mb),拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)位点丰度最低(286.48 个/Mb);枝鳃亚目中斑节对虾(*Penaeus monodon*) EST-SSR 位点最为丰富(641.19 个/Mb),白滨对虾(*Litopenaeus setiferus*)位点丰度最低(166.96 个/Mb);腹胚亚目和枝鳃亚目中均是二、三、四核苷酸基元的 SSR 较为常见,在腹胚亚目中占总数的 41.11%,在枝鳃亚目中占总数的 28.00%;复合(I)类型的 SSR 在腹胚亚目(51.38%)和枝鳃亚目(65.13%)中占很大比例;腹胚亚目二核苷酸基元的 SSR 中 AC/GT 分布频率最高,三核苷酸基元的 SSR 中 ACC/GGT 和 AAT/ATT 占优势;枝鳃亚目二核苷酸基元的 SSR 中 AG/CT 占优势,三核苷酸基元的 SSR 中 AAT/ATT 的分布频率高于其他三核苷酸基元。此外,对脊尾白虾含有 SSR 的 EST 进行 GO 分析后发现,细胞代谢过程、链接产物、细胞组分和细胞的比例分别在 3 个类型的注释中占优势。本研究加深了对十足目甲壳动物 SSR 分布规律的认识,可为甲壳动物 EST-SSR 标记的开发及实际应用提供参考。

关键词 十足目;甲壳动物;EST-SSR

中图分类号 Q959.223 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2019)03-0094-09

十足目动物是甲壳动物中种类最多(8000~10000 种)、进化位阶最高、经济价值最大的一个生物类群(堵南山,1993)。近年来,随着人们对优质水产品的需求增加,包括龙虾、螯虾、蟹和对虾等的腹胚亚目和枝鳃亚目在内的十足目动物在水产养殖中的地位日益突出,因此,有必要加强种质鉴定和群体遗传学研究。发展十足目甲壳动物基因组中大量有效的分子标记,可以帮助保护种质资源,改善影响重要性状基

因和分子标记辅助基因的识别和开发。作为优良遗传标记的微卫星(Microsatellite)与其他分子标记相比,具有较高稳定性、共显性表达、多态性信息丰富、易于检测等特点,被大量应用于构建遗传图谱(Guo *et al*, 2017)、基因定位(Zhou *et al*, 2017)、遗传多样性分析(王日芳等,2017)及亲缘关系鉴定(李东宇等,2016)等。

研究各物种基因组特征,第一步需要生成表达序列标签(Expressed sequence tag, EST)信息。EST在物

* 农业产业技术体系(CARS-48)、山东省泰山产业领军人才工程项目(LNJY2015002)、国家自然科学基金(31472275)和青岛市产业培育计划科技惠民专项(17-3-3-62-nsh)共同资助 [This work was supported by the Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-48), Program of Shandong Leading Talent (LNJY2015002), National Natural Science Foundation of China (31472275), and Qingdao Industrial Development Program (Science and Technology Benefit Special Project) (17-3-3-62-nsh)]. 高海钰, E-mail: hygao163@163.com

① 通讯作者:李健,研究员, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

收稿日期:2017-12-26, 收修修改稿日期:2018-04-19

种间高度保守,具有良好的通用性(Varshney *et al.*, 2005),目前已广泛应用于多种植物(Yumurtaci *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2013)和动物(白俊艳等, 2016)。在甲壳类动物如中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) (Wang *et al.*, 2005)、日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*) (周巧, 2013)等中也有报道,例如EST-SSR在EST中的分布频率、大小、引物开发等。

本研究运用生物信息学方法,从 GenBank 的 EST 数据库中收集 21 种十足目甲壳动物 EST 数据,发掘 EST-SSR 信息,通过比较不同十足目甲壳动物间 EST 的特点及不同基元 EST-SSR 的分布频率和类型,加深对十足目甲壳动物 SSR 分布规律的认识,为甲壳动物 EST-SSR 标记的开发及实际应用提供参考。此外,对脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)含有 SSR 的 EST 进行 GO 分析,进一步对脊尾白虾功能基因研究提供重要信息。

1 材料与方法

1.1 数据来源

EST数据来源于GenBank(www.ncbi.nih.gov)中的dbEST数据库,截止于2017年9月1日。包括21种十足目甲壳动物:美国龙虾(*Homarus americanus*)、淡水螯虾(*Pacifastacus leniusculus*)、日本龙虾(*Panulirus japonicus*)、拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)、招潮蟹(*Uca pugilator*)、红蟹(*Gecarcoidea natalis*)、珍宝蟹(*Metacarcinus magister*)、蓝蟹(*Callinectes sapidus*)、岸蟹(*Carcinus maenas*)、脆壳蟹(*Petrolisthes cinctipes*)、脊尾白虾、日本沼虾、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)以及凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)、中国明对虾、日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)、白滨对虾(*Litopenaeus setiferus*)。物种及EST信息详列于表1。

1.2 EST 数据处理

本实验采用EMBOSS软件中的TRIMEST工具,去除尾部包含Poly-A或T的EST序列,利用CROSS_MATCH软件截去过短的序列片段;运行CAP3软件对EST序列进行聚类 and 拼接处理,获得非冗余EST,包括Contigs和Singlets两类序列(黄启星等, 2012)。

1.3 EST-SSR 分析

采用自行编写的Perl语言脚本程序对处理后的

EST序列进行SSR筛选。筛选标准为二核苷酸重复次数 ≥ 6 次,三、四、五和六核苷酸重复次数 ≥ 5 次。同时,筛选重复基元之间没有插入序列的复合型SSR位点(Compound microsatellite),即复合(I)型;筛选重复基元之间存在插入序列长度 ≤ 100 nt的复合型SSR,即复合(II)型。

1.4 脊尾白虾 EST 的功能注释

使用BLAST将Unigenes与NCBI的NR蛋白数据库和Uniprot蛋白数据库进行比对,设置E值为“ 10^{-5} ”(孙政等, 2013),利用Interproscan搜索得到的GO编号对Unigenes按照分子功能、细胞组分和生物学过程进行分类(Ye *et al.*, 2006)。

2 结果与分析

2.1 甲壳动物 EST 长度及 SSR 位点数

从GenBank数据库下载了21种十足目甲壳动物已发布的EST。由表1可见,16种腹胚亚目的EST共242178条,碱基总长度约为183.50 Mb。处理后获得85647条非冗余EST序列,包括30120条Contigs和55527条Singlets序列,碱基总长度约为66.72 Mb。从27536条Unigenes序列发掘34601个SSR位点,占EST总数的32.15%。其中,脊尾白虾含有SSR位点的EST最丰富(43.00%),分布频率为868.02个/Mb;拟穴青蟹含有SSR位点的EST所占百分比最小(12.70%),分布频率为286.48个/Mb。

由表2可见,5种枝鳃亚目的EST共231130条,碱基总长度约为141.28 Mb。获得的59605条Unigenes序列中包括20506条Contigs和39099条Singlets序列,碱基总长度约为37.89 Mb。从5种枝鳃亚目的18475条Unigenes序列中发掘出21911个SSR位点,占EST总数的31.00%。其中,斑节对虾含有SSR位点的EST占总数的百分比最大,为35.49%,分布频率为641.19个/Mb;白滨对虾含有SSR位点的EST所占百分比最小(10.56%),分布频率为166.96个/Mb。

2.2 甲壳动物不同基元 EST-SSR 的分布频率

表3和表4列出了十足目甲壳动物不同类型EST-SSR的数量和分布频率。在腹胚亚目和枝鳃亚目EST序列中,复合(I)型远高于其他类型,分别占总数的51.38%、65.13%;二核苷酸、三核苷酸和四核苷酸基元的SSR数目相差不多,多于五核苷酸和六核苷酸基元的SSR数目,三者腹胚亚目中占总数的41.11%,在枝鳃亚目中占总数的28.00%。在2种

表1 腹胚亚目 EST、Unigenes 及 SSR 在 Unigenes 序列中的丰度分布
Tab.1 The EST, Unigenes and abundance of SSR in Unigenes of Pleocyemata

物种 Species	EST 个数 EST number	EST 长度 EST length (Mb)	非冗余 EST Non-redundant EST			含有 SSR 位点的 Unigenes Unigenes containing SSR site		
			Congtigs 数量 Congtigs number	Singlets 数量 Singlets number	长度 Length (Mb)	数量 Number	SSR 数量 SSR Number	频率 Frequency (个/Mb)
美国龙虾 <i>H. americanus</i>	51833	42.59	8581	13338	17.78	5907	7097	399.13
淡水螯虾 <i>P. leniusculus</i>	1063	0.69	123	361	0.32	170	200	630.15
日本龙虾 <i>P. japonicus</i>	2679	1.78	240	706	0.61	221	249	408.62
拟穴青蟹 <i>S. paramamosain</i>	3975	1.85	34	3903	1.83	500	524	286.48
中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i>	17067	10.45	1339	4664	3.86	2302	2797	723.81
三疣梭子蟹 <i>P. trituberculatus</i>	14396	11.00	1016	3069	3.42	1316	1569	458.13
克氏原螯虾 <i>P. clarkii</i>	917	0.53	85	98	0.11	21	27	249.08
招潮蟹 <i>U. pugilator</i>	3646	2.14	452	1019	0.93	463	565	609.65
红蟹 <i>G. natalis</i>	2118	0.92	163	459	0.26	142	155	590.04
珍宝蟹 <i>M. magister</i>	1137	0.80	154	277	0.27	115	128	471.48
蓝蟹 <i>C. sapidus</i>	10930	9.51	865	1433	2.04	1057	1472	723.29
岸蟹 <i>C. maenas</i>	24570	20.91	4545	6708	8.87	2926	3471	391.23
脆壳蟹 <i>P. cinctipes</i>	97806	73.28	11593	15439	22.86	10908	14595	638.36
脊尾白虾 <i>P. carinicauda</i>	2900	1.57	218	1678	1.13	818	985	868.02
日本龙虾 <i>P. japonicus</i>	2679	1.78	240	706	0.61	221	249	408.62
罗氏沼虾 <i>M. rosenbergii</i>	4462	3.70	472	1669	1.81	449	518	286.72

表2 枝鳃亚目 EST、Unigenes 及 SSR 在 Unigenes 序列中的丰度分布
Tab.2 The EST, Unigenes and abundance of SSR in Unigenes of Dendrobranchiata

物种 Species	EST 个数 EST number	EST 长度 EST length (Mb)	非冗余 EST Non-redundant EST			含有 SSR 位点的 Unigenes Unigenes containing SSR site		
			Congtigs 数量 Congtigs number	Singlets 数量 Singlets number	长度 Length (Mb)	数量 Number	SSR 数量 SSR Number	频率 Frequency (个/Mb)
凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	163062	99.53	14048	19216	21.23	9791	11779	554.74
斑节对虾 <i>P. monodon</i>	52714	33.27	4946	15037	12.98	7091	8323	641.19
中国明对虾 <i>F. chinensis</i>	10512	5.25	1064	2431	1.77	813	891	504.08
日本囊对虾 <i>M. japonicus</i>	3783	2.54	374	1684	1.37	695	828	603.90
白滨对虾 <i>L. setiferus</i>	1059	0.68	74	731	0.54	85	90	166.96

亚目中,五核苷酸和六核苷酸基元的 SSR 数目占有很小的比例,在腹胚亚目中分别占总数的 3.67%、0.99%,在枝鳃亚目中分别占总数的 2.01%、1.33%。克氏原螯虾和淡水螯虾的 EST 序列中没有搜索到六核苷酸基元的 SSR 位点。

2.3 甲壳动物 EST-SSR 的主要类型

表 5 和表 6 列出了二、三核苷酸基元的 SSR 在各物种内的数量和分布频率。21 种十足目甲壳动物

中,各种类型的基元分布频率不一,有的基元甚至没有出现。不同基元的 SSR 在 21 种甲壳动物中的分布频率具有很大的差异。16 种腹胚亚目中,二核苷酸基元的 SSR 中分布频率最高的类型为 AC/GT,远高于 CG/CG 的分布频率,AG/CT 和 AT/AT 次之;三核苷酸基元的 SSR 中,分布频率最高的集中于 ACC/GGT 和 AAT/ATT,远高于 ACG/CGT 的分布频率。5 种枝鳃亚目中,二核苷酸基元 SSR 中,AG/CT 的分布频率最高;三核苷酸基元的 SSR 中,AAT/ATT

表 3 腹胚亚目不同重复单元 EST-SSR 的数量和分布频率

Tab.3 The number and frequency of SSR containing different size of repeat unit of EST sequences in Pleocyemata

物种 Species	复合(I) Compound SSRs(I)	复合(II) Compound SSRs(II)	二核苷酸 Dinucleotide	三核苷酸 Trinucleotide	四核苷酸 Tetranuc- leotide	五核苷酸 Pentanuc- leotide	六核苷酸 Hexnuc- leotide	合计 Total
美国龙虾 <i>H. americanus</i>	3441(193.52)	226(12.71)	882(49.60)	1330(74.80)	755(42.46)	402(22.61)	61(3.43)	7097(399.13)
淡水螯虾 <i>P. leniusculus</i>	65(204.80)	2(6.30)	17(53.56)	103(324.53)	12(37.81)	1(3.15)	0(0)	200(630.15)
日本龙虾 <i>P. japonicus</i>	140(229.74)	4(6.56)	38(62.36)	37(60.72)	27(44.31)	2(3.28)	1(1.64)	249(408.62)
拟穴青蟹 <i>S. paramamosain</i>	201(109.89)	15(8.20)	67(36.63)	121(66.15)	86(47.02)	29(15.85)	5(2.73)	524(286.48)
中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i>	1617(418.45)	66(17.08)	316(81.78)	439(113.61)	224(57.97)	62(16.04)	73(18.90)	2797(723.81)
三疣梭子蟹 <i>P. trituberculatus</i>	813(237.39)	37(10.80)	200(58.40)	361(105.41)	104(30.37)	31(9.05)	23(6.72)	1569(458.13)
克氏原螯虾 <i>P. clarkii</i>	9(83.03)	0(0)	3(27.68)	9(83.03)	3(27.68)	3(27.68)	0(0)	27(249.08)
招潮蟹 <i>U. pugilator</i>	294(317.23)	27(29.13)	79(85.24)	91(98.19)	61(65.82)	8(8.63)	5(5.40)	565(609.65)
红蟹 <i>G. natalis</i>	94(357.83)	4(15.23)	18(68.52)	23(87.55)	14(53.29)	1(3.81)	1(3.81)	155(590.04)
珍宝蟹 <i>M. magister</i>	68(250.47)	5(18.42)	7(25.78)	27(99.45)	16(58.94)	2(7.37)	3(11.05)	128(471.48)
蓝蟹 <i>C. sapidus</i>	850(417.66)	31(15.23)	134(65.84)	306(150.36)	105(51.59)	24(11.79)	22(10.81)	1472(723.29)
岸蟹 <i>C. maenas</i>	1655(186.54)	94(10.60)	419(47.23)	775(87.35)	350(39.45)	146(16.46)	32(3.61)	3471(391.23)
脆壳蟹 <i>P. cinctipes</i>	7505(328.26)	430(18.81)	1545(67.58)	2431(106.33)	2044(89.40)	553(24.19)	87(3.81)	14595(638.36)
脊尾白虾 <i>P. carinicaude</i>	682(601.01)	20(17.62)	189(166.55)	41(36.13)	38(33.49)	8(7.05)	7(6.17)	985(868.02)
日本沼虾 <i>M. nipponense</i>	678(124.60)	41(7.53)	185(34.00)	311(57.15)	162(29.77)	27(4.96)	30(5.51)	1434(263.53)
罗氏沼虾 <i>M. rosenbergii</i>	274(151.66)	18(9.96)	79(43.73)	67(37.09)	60(33.21)	14(7.75)	6(3.32)	518(286.72)
合计 Total	18386(275.57)	1020(15.29)	4178(62.62)	6472(97)	4061(60.87)	1313(19.68)	356(5.34)	35786(536.36)

表 4 枝鳃亚目不同重复单元 EST-SSR 的数量和分布频率

Tab.4 The number and frequency of SSR containing different size of repeat unit of EST sequences in Dendrobranchiata

物种 Species	复合(I) Compound SSRs(I)	复合(II) Compound SSRs(II)	二核苷酸 Di- nucleotide	三核苷酸 Tri- nucleotide	四核苷酸 Tetra- nucleotide	五核苷酸 Penta- nucleotide	六核苷酸 Hex- nucleotide	合计 Total
凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	7261(341.96)	362(17.05)	1135(53.45)	1183(55.71)	1357(63.91)	306(14.41)	175(8.24)	11779(554.74)
斑节对虾 <i>P. monodon</i>	5828(448.98)	357(27.50)	725(55.85)	620(47.76)	598(46.07)	110(8.47)	85(6.55)	8323(641.19)
中国明对虾 <i>F. chinensis</i>	619(350.20)	19(10.75)	75(42.43)	77(43.56)	73(41.30)	13(7.35)	15(8.49)	891(504.08)
日本囊对虾 <i>M. japonicus</i>	525(382.91)	34(24.80)	92(67.10)	74(53.97)	77(56.16)	10(7.29)	16(11.67)	828(603.90)
白滨对虾 <i>L. setiferus</i>	38(70.49)	1(1.86)	9(16.70)	25(46.38)	14(25.97)	2(3.71)	1(1.86)	90(166.96)
合计 Total	14271(376.64)	773(20.4)	2036(53.73)	1979(52.23)	2119(55.93)	441(11.64)	292(7.71)	21911(578.28)

表 5 腹胚亚目中二、三核苷酸基元 SSR 的数量和频率分布
 Tab.5 The number and frequency of EST-SSR with di- and tri-nucleotide motifs in Pleocyemata

重复基元 Repeat motifs	AC/GT	AG/CT	AT/AT	CG/CG	AAC /GTT	AAG /CTT	AAT /ATT	ACC /GGT	ACG /CGT	ACT /AGT	AGC/ CTG	AGG /CCT	ATC /ATG	CCG /CGG	合计 Total
美国龙虾 <i>H. americanus</i>	982 (55.23)	375 (21.09)	1240 (69.74)	3 (0.17)	221 (12.43)	250 (14.06)	657 (36.95)	717 (40.33)	23 (1.29)	113 (6.36)	328 (18.45)	306 (17.21)	260 (14.62)	59 (3.32)	5534 (17.78)
淡水螯虾 <i>P. leniusculus</i>	2 (6.25)	5 (15.63)	2 (6.25)	1 (3.13)	5 (15.63)	2 (6.25)	8 (25)	20 (62.5)	0 (0)	1 (3.13)	16 (50)	1 (3.13)	0 (0)	0 (0)	63 (0.32)
日本龙虾 <i>P. japonicus</i>	32 (52.46)	21 (34.43)	37 (60.66)	1 (1.64)	3 (4.92)	8 (13.11)	13 (21.31)	12 (19.67)	1 (1.64)	2 (3.28)	16 (26.23)	9 (14.75)	7 (11.48)	1 (1.64)	163 (0.61)
拟穴青蟹 <i>S. paramamosain</i>	53 (28.96)	39 (21.31)	5 (2.73)	1 (0.55)	8 (4.37)	17 (9.29)	13 (7.1)	39 (21.31)	1 (0.55)	20 (10.93)	33 (18.03)	38 (20.77)	17 (9.29)	2 (1.09)	286 (1.83)
中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i>	697 (180.57)	335 (86.79)	150 (38.86)	2 (0.52)	226 (58.55)	426 (110.36)	312 (80.83)	792 (205.18)	52 (13.47)	270 (69.95)	351 (90.93)	908 (235.23)	232 (60.1)	383 (99.22)	5136 (3.86)
三疣梭子蟹 <i>P. trituberculatus</i>	251 (73.39)	170 (49.71)	57 (16.67)	5 (1.46)	35 (10.23)	48 (14.04)	84 (24.56)	167 (48.83)	2 (0.58)	60 (17.54)	103 (30.12)	194 (56.73)	36 (10.53)	14 (4.09)	1226 (3.42)
克氏原螯虾 <i>P. clarkii</i>	1 (9.09)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (18.18)	0 (0)	0 (0)	13 (118.18)	0 (0)	0 (0)	1 (9.09)	4 (36.36)	0 (0)	2 (18.18)	23 (0.11)
招潮蟹 <i>U. pugilator</i>	91 (97.85)	63 (67.74)	18 (19.35)	1 (1.08)	12 (12.9)	14 (15.05)	112 (120.43)	33 (35.48)	0 (0)	21 (22.58)	31 (33.33)	26 (27.96)	17 (18.28)	19 (20.43)	458 (0.93)
红蟹 <i>G. natalis</i>	19 (73.08)	23 (88.46)	3 (11.54)	0 (0)	3 (11.54)	10 (38.46)	14 (53.85)	16 (61.54)	4 (15.38)	1 (38.46)	10 (38.46)	32 (123.08)	6 (23.08)	3 (11.54)	153 (0.26)
珍宝蟹 <i>M. magister</i>	14 (51.85)	8 (29.63)	1 (3.7)	0 (0)	4 (14.81)	7 (25.93)	8 (29.63)	19 (70.37)	0 (0)	2 (7.41)	6 (22.22)	9 (33.33)	6 (22.22)	8 (29.63)	92 (0.27)
蓝蟹 <i>C. sapidus</i>	308 (150.98)	104 (50.98)	34 (16.67)	4 (1.96)	34 (16.67)	32 (15.69)	55 (26.96)	282 (138.24)	3 (1.47)	47 (23.04)	194 (95.10)	136 (66.67)	35 (17.16)	121 (59.31)	1389 (2.04)
岸蟹 <i>C. maenas</i>	525 (59.19)	188 (21.2)	500 (56.37)	1 (0.11)	112 (12.63)	151 (17.02)	215 (24.24)	503 (56.71)	14 (1.58)	54 (6.09)	218 (24.58)	209 (23.56)	129 (14.54)	47 (5.3)	2866 (8.87)
脆壳蟹 <i>P. cinctipes</i>	2822 (123.45)	1101 (48.16)	576 (25.2)	1 (0.04)	1882 (82.33)	340 (14.87)	1695 (74.15)	969 (42.39)	80 (3.5)	520 (22.75)	361 (15.79)	594 (25.98)	652 (28.52)	20 (0.87)	11613 (22.86)
脊尾白虾 <i>P. carinicaude</i>	44 (38.94)	1269 (1123.01)	32 (28.32)	0 (0)	6 (5.31)	17 (15.04)	95 (84.07)	3 (2.65)	0 (0)	8 (7.08)	5 (4.42)	13 (11.5)	12 (10.62)	0 (0)	1504 (1.13)
日本沼虾 <i>M. nipponense</i>	73 (13.42)	269 (49.45)	74 (13.6)	1 (0.18)	58 (10.66)	92 (16.91)	47 (8.64)	58 (10.66)	12 (2.21)	45 (8.27)	86 (15.81)	92 (16.91)	89 (16.36)	14 (2.57)	1010 (5.44)
罗氏沼虾 <i>M. rosenbergii</i>	27 (14.92)	69 (38.12)	100 (55.25)	3 (1.66)	8 (4.42)	28 (15.47)	39 (21.55)	11 (6.08)	13 (7.18)	7 (3.87)	18 (9.94)	14 (7.73)	28 (15.47)	0 (0)	365 (1.81)
合计 Total	5941 (89.04)	4039 (60.54)	2829 (42.4)	24 (0.36)	2619 (39.25)	1442 (21.61)	3367 (50.46)	3654 (54.77)	205 (3.07)	1180 (17.69)	1777 (26.63)	2585 (38.74)	1526 (22.87)	693 (10.39)	31881 (477.83)

表 6 枝鳃亚目中二、三核苷酸基元 SSR 的数量和频率分布
Tab.6 The number and frequency of EST-SSR with di- and tri-nucleotide motifs in Dendrobranchiata

重复基元 Repeat motifs	AC/GT	AG/CT	AT/AT	CG /CG	AAC /GTT	AAG /CTT	AAT /ATT	ACC /GGT	ACG /CGT	ACT /AGT	AGC /CTG	AG G/CC T	ATC /ATG	CCG /CGG	合计 Total
凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	1756 (82.71)	2186 (102.97)	647 (30.48)	18 (0.85)	282 (13.28)	792 (37.31)	1530 (72.07)	130 (6.12)	168 (7.91)	158 (7.44)	171 (8.05)	640 (30.15)	570 (26.85)	42 (1.98)	9090 (21.23)
斑节对虾 <i>P. monodon</i>	1283 (98.84)	2085 (160.63)	1560 (120.18)	126 (9.71)	167 (12.87)	566 (43.61)	1495 (115.18)	105 (8.09)	40 (3.08)	115 (8.86)	133 (10.25)	365 (28.12)	274 (21.11)	32 (2.47)	8346 (12.98)
中国明对虾 <i>F. chinensis</i>	85 (48.02)	81 (45.76)	161 (90.96)	0 (0)	7 (3.95)	32 (18.08)	120 (67.8)	12 (6.78)	8 (4.52)	7 (3.95)	16 (9.04)	20 (11.3)	31 (17.51)	0 (0)	580 (1.77)
日本囊对虾 <i>M. japonicus</i>	113 (82.48)	14 7(107.3)	151 (110.22)	1 (0.73)	19 (13.87)	33 (24.09)	79 (57.66)	16 (11.68)	6 (4.38)	18 (13.14)	19 (13.87)	44 (32.12)	25 (18.25)	7 (5.11)	678 (1.37)
白滨对虾 <i>L. setiferus</i>	15 (27.78)	7 (12.96)	5 (9.26)	0 (0)	0 (0)	6 (11.11)	19 (35.19)	5 (9.26)	1 (1.85)	0 (0)	4 (7.41)	1 (1.85)	6 (11.11)	0 (0)	69 (0.54)
合计 Total	3252 (85.83)	4506 (118.92)	2524 (66.61)	145 (3.83)	475 (12.54)	1429 (37.71)	3243 (85.59)	268 (7.07)	223 (5.89)	298 (7.86)	343 (9.05)	1070 (28.24)	906 (23.91)	81 (2.14)	18763 (495.2)

的分布频率远高于其他类型的三核苷酸基元。从整体来看, 21 种十足目甲壳动物的 SSR 中多为富含 A/T 的类型。

2.4 脊尾白虾 EST 功能注释

通过 Blast2GO 功能注释工具, 比对脊尾白虾含 SSR 的序列与 NCBI 数据库中已知物种的基因(图 1), 脊尾白虾 EST-SSR 注释过程中引用已知注释基因的物种主要为端足虫(*Hyalella azteca*)(4.67%), 此外, 白滨对虾为 1.83%, 蓝蟹为 1.37%, 日本囊对虾和克氏原螯虾分别为 1.28%和 0.92%。

将脊尾白虾含有 SSR 的 EST 序列从生物学过程、分子功能和细胞组分 3 类进行 GO 分析。其中 47 条 (5.87%)序列有一个或多个已经预测的功能。由图 2 可以看出, 在 11 个生物学过程中细胞代谢过程所占比例最大, 达到 20%, 其次, 定位和代谢过程的比例为 18%。如图 3 所示, 5 种分子功能被记录 47 次, 其中, 链接产物的比例最大为 47%, 其次, 催化活性的比例为 28%。如图 4 所示, 9 个细胞组分中, 细胞组分和细胞比例为 24%。

3 讨论

本研究分析了 21 种十足目甲壳动物 EST 序列中 SSR 的分布频率和重复基元的特点, 发现腹胚亚目中含有 SSR 位点的非冗余 EST 序列占总数的 32.15%, 枝鳃亚目中为 31.00%, 二者比例均高于其他水产动物, 如牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)中的比例为 7.95% (陈松波等, 2010), 在斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)中的比例为 11.2%(Serapion *et al*, 2004), 在东部牡蛎

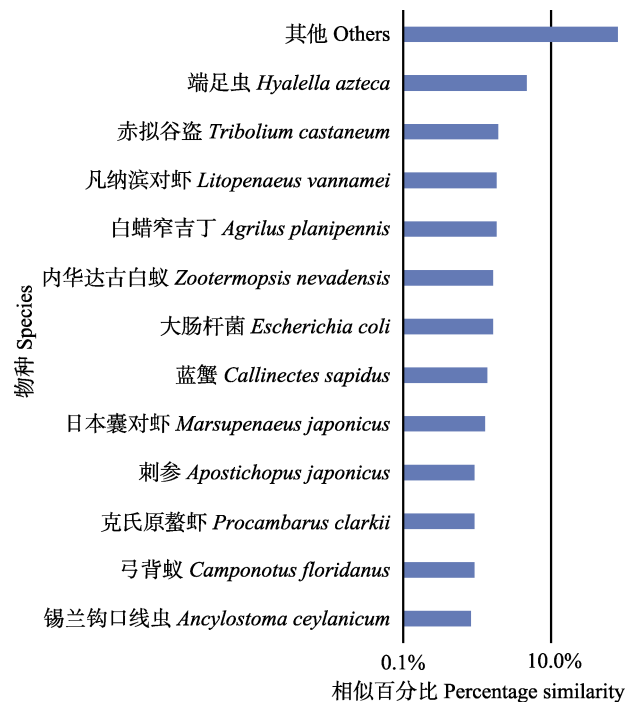


图 1 脊尾白虾 EST-SSR 与其他物种相似度统计图
Fig.1 Percentage similarity of Top-Blast hits for EST-SSR in *E. carinicauda* against other species

(*Crassostrea virginica*)中的比例为 1.4% (Wang *et al*, 2007), 在金头鲷(*Sparus aurata*)中的比例为 4.94% (Vogiatzi *et al*, 2011)。这些差异可能是因为 EST-SSR 在水产动物中的物种特异性较高(陈松波等, 2010), 也可能是使用不同的搜索软件或者搜索条件不同所引起的。

在腹胚亚目和枝鳃亚目中, 不同重复基元 SSR 的分布频率有着非常明显且一致的分布特征, 均是复

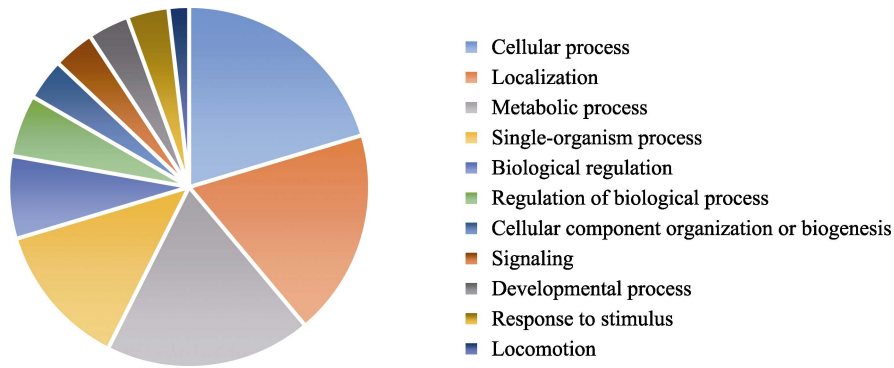


图 2 GO 分析-生物学过程
Fig.2 GO analysis-Biological process

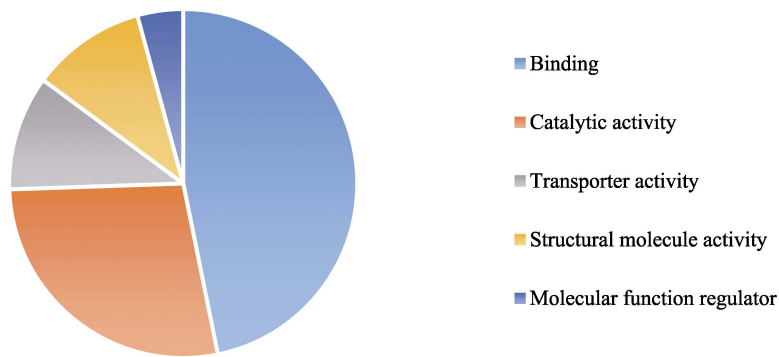


图 3 GO 分析-分子功能
Fig.3 GO analysis-Molecular function

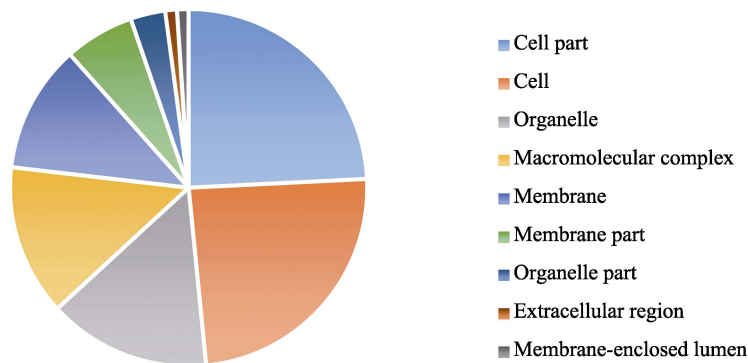


图 4 GO 分析-细胞组分
Fig.4 GO analysis-Cellular component

合(I)型远高于其他类型,斑鳢中复合 SSR 类型也占有相当的比例(占总数的 7.07%)(谢楠等, 2016)。二、三、四核苷酸基元的数目多于五、六核苷酸基元,在其他的水产动物如牙鲆(陈松波等, 2010)和金头鲷(Vogiati *et al.*, 2011)中,同样是二、三核苷酸基元的数目较多, Wang 等(2005)研究发现,中国对虾 EST-SSR 中三核苷酸基元的数目最多,与本研究对中国对虾的结果相一致;十足目甲壳动物中四核苷酸基元的数目也占很大比例,特别是在凡纳滨对虾中,四核苷酸数目最多,相似的报告较少。

腹胚亚目中二核苷酸重复中分布频率最高的类型为 AC/GT,同 Vogiatzi 等(2011)对金头鲷的研究中发现 AC/GT 占优势的结果相一致;枝鳃亚目中较高的类型为 AG/CT,同样在南亚野鲮(*Labeo rohita*)的研究中发现 AG/CT 占优势(Dinesh *et al.*, 2013)。2 种亚目中均为 CG/CG 的分布频率最低,其中,中国明对虾、脊尾白虾、白滨对虾、克氏原螯虾、红蟹和珍宝蟹中没有 CG/CG 类型,大部分鱼类的研究中,也没有 CG/CG 类型(Ju *et al.*, 2005)。不同三核苷酸基元的 SSR 的分布频率在不同物种中差异较大,整体上来

看, 在枝鳃亚目中分布较腹胚亚目集中, 枝鳃亚目中为 AAT/ATT 最多, 腹胚亚目中较多的类型集中于 ACC/GGT、AAT/ATT, 3 种核苷酸基元均为富含 A/T 的 SSR, 在许氏平鲉(*Sebastes schlegelii*)的研究中, 三核苷酸基元同样为富含 A/T 的 CTG/CAG 和 GAA/TTC 出现频率最高(薛蕊等, 2015)。

比对脊尾白虾含 SSR 的序列与 NCBI 数据库中已知物种的基因, 发现脊尾白虾同虾蟹类的基因相似度较低, Wang 等(2017)的研究发现, 脊尾白虾与凡纳滨对虾和斑节对虾等物种的基因相似比例也较低, 主要原因是 NCBI 数据库中有关十足目甲壳动物的数据资源较少。GO 分析后发现, 细胞代谢过程、链接产物、细胞组分和细胞的比例分别在 3 个类型的注释中占优势, 这与凡纳滨对虾(孙政等, 2013)和梭鲈(*Sander lucioperca*)(Han *et al.*, 2016)的研究结果相一致。

4 结论

本研究发现十足目甲壳动物中 EST-SSR 出现频率较高, 2 种亚目中二、三、四核苷酸基元的 SSR 较多, 且类型丰富。EST-SSR 信息的挖掘有利于加深人们对于十足目甲壳动物 SSR 分布规律的认识, 为甲壳动物 EST-SSR 标记的开发及实际应用提供参考, 推动甲壳动物种质资源的创新利用。针对脊尾白虾的基因功能注释分析发现, 在 3 个类型的注释中, 细胞代谢过程、链接产物、细胞组分和细胞的比例占有优势, 为脊尾白虾在基因功能方面的深入研究提供参考资料。

参 考 文 献

- Bai JY, Pang YZ, Yang YB, *et al.* Development and application of EST-SSR markers in the black quail. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2016, 48(11): 49–51 [白俊艳, 庞有志, 杨又兵, 等. 黄羽鹌鹑 EST-SSR 标记的开发与应用. *畜牧与兽医*, 2016, 48(11): 49–51]
- Chen SB, Gong L, Liu HJ. Analysis of SSR information in EST resources of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Northeast Agricultural University*, 2010, 42(42): 1215–1220 [陈松波, 龚丽, 刘海金. 牙鲆 EST 资源的 SSR 信息分析. *东北农业大学学报*, 2010, 42(42): 1215–1220]
- Dinesh KS, Soumya PP, Sujata P, *et al.* Identification of reproduction-related genes and SSR-markers through expressed sequence tags analysis of a monsoon breeding carp rohu, *Labeo rohita* (Hamilton). *Gene*, 2013, 524(1): 1–14
- Du NS. *Crustacean biology*. Beijing: Science Press, 1993, 675–760 [堵南山. 甲壳动物学. 北京: 科学出版社, 1993, 675–760]
- Guo Q, Guo LL, Zhang L, *et al.* Construction of a genetic linkage map in tree peony (*Paeonia Sect. Moutan*) using simple sequence repeat (SSR) markers. *Scientia Horticulturae*, 2017, 219: 294–301
- Han X, Ling Q, Li C, *et al.* Characterization of pikeperch (*Sander lucioperca*) transcriptome and development of SSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2016, 66: 188–195
- Huang QX, Zuo J, Kong H, *et al.* Data-mining and diversity analysis of EST-SSRs from 11 tropical plant species. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2012, 33(7): 1208–1214 [黄启星, 左娇, 孔华, 等. 11 种热带植物 EST-SSR 标记的开发和多样性分析. *热带作物学报*, 2012, 33(7): 1208–1214]
- Ju Z, Wells MC, Martinez A, *et al.* An in silico mining for simple sequence repeats from expressed sequence tags of zebrafish, medaka, fundulus, and xiphophorus. *In Silico Biology*, 2005, 5: 439–463
- Li DY, Kong J, Meng XH, *et al.* Development of multiplex PCR systems of microsatellite markers for pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and its application for parentage identification. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(3): 58–67 [李东宇, 孔杰, 孟宪红, 等. 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 微卫星多重 PCR 体系的建立及其在家系亲缘鉴定中的应用. *渔业科学进展*, 2016, 37(3): 58–67]
- Serapion J, Kucuktas H, Feng JN, *et al.* Bioinformatic mining of type I microsatellites from expressed sequence tags of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Marine Biotechnology*, 2004, 6(4): 364–377
- Singh RK, Jena SN, Khan S, *et al.* Development, cross-species/genera transferability of novel EST-SSR markers and their utility in revealing population structure and genetic diversity in sugarcane. *Gene*, 2013, 524(2): 309–329
- Sun Z, Liu CZ, Li FH, *et al.* Bioinformatic processing of a large number of *Litopenaeus vannamei* ESTs and analysis of tissue-specific gene expression. *Acta Oceanologica Sinica*, 2013, 35(5): 128–136 [孙政, 柳承璋, 李富花, 等. 凡纳滨对虾大量 EST 的生物信息学分析. *海洋学报*, 2013, 35(5): 128–136]
- Varshney RK, Graner A, Sorrells ME. Genic microsatellite markers in plants: Features and applications. *Trends in Biotechnology*, 2005, 23(1): 48–55
- Vogiatzi E, Lagnel J, Pakaki V, *et al.* In silico mining and characterization of simple sequence repeats from gilthead sea bream (*Sparus aurata*) expressed sequence tags (EST-SSRs): PCR amplification, polymorphism evaluation and multiplexing and cross-species assays. *Marine Genomics*, 2011, 4(2): 83–91
- Wang HX, Li FH, Xiang JH. Polymorphic EST-SSR markers and their mode of inheritance in *Fenneropenaeus chinensis*. *Aquaculture*, 2005, 249(1–4): 107–114
- Wang JJ, Ge QQ, Li JT, *et al.* Identification of novel EST-SSR markers by transcriptome sequencing in ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*. *Genes and Genomics*, 2017, 40(1): 1–9
- Wang RF, Li J, Li JT, *et al.* Genetic analysis of 33 microsatellite loci in 3 families of *Exopalaemon carinicauda* inbred line. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(4): 78–86 [王日芳, 李健, 李吉涛, 等. 脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*) 近交系 3 个家系 33 个微卫星座位的遗传分析. *渔业科学进展*, 2017, 38(4): 78–86]
- Wang YP, Guo XM. Development and characterization of EST-SSR markers in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Biotechnology*, 2007, 9(4): 500–511

- Xie N, Liu K, Feng XY, *et al.* Analysis of simple sequence repeats information in expressed sequence tags of *Channa argus* and *Channa maculatus*. *Freshwater Fisheries*, 2016, 44(3): 16–22 [谢楠, 刘凯, 冯晓宇, 等. 乌鳢和斑鳢 EST 序列微卫星信息分析. *淡水渔业*, 2016, 44(3): 16–22]
- Xue R. Development of EST-SSR markers and genetics assessment of fast-growing breeding line for the black rockfish, *Sebastes schlegelii*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2015 [薛蕊. 许氏平鲷 (*Sebastes schlegelii*) EST-SSR 标记开发及快速生长选育系遗传结构分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2015]
- Ye J, Fang L, Zheng H, *et al.* WEGO: A web tool for plotting GO annotations. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34: 293–297
- Yumurtaci A, Sipahi H, Al-Abdallat A, *et al.* Construction of new EST-SSRs for *Fusarium* resistant wheat breeding. *Computational Biology and Chemistry*, 2017, 68: 22–28
- Zhou L, Liu T, Cheng YK, *et al.* Molecular mapping of a stripe rust resistance gene in Chinese wheat landrace “Hejiangyizai” using SSR, RGAP, TRAP, and SRAP markers. *Crop Protection*, 2017, 94: 178–184
- Zhou Q. Screening of highly polymorphic EST-SSR markers and investigation of genetic diversity in *Macrobrachium nipponensis*. Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2013 [周巧. 青虾高多态性 EST-SSR 标记的筛选及遗传多样性的研究. 南京农业大学硕士研究生学位论文, 2013]

(编辑 冯小花)

Analysis of SSR Information in EST Resource of Decapod Crustaceans

GAO Haiyu^{1,2,3}, LI Jian^{1,2,3}①, WANG Jiajia^{2,3}, LI Jitao^{2,3}

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

Abstract The distribution frequency and characteristic of base repeats of EST-SSR (expressed sequence tag - simple sequence repeats) were induced and analyzed in 21 kinds of decapod crustaceans by applying bioinformatics methods. The results showed that EST-SSR abundances were different between various crustacean species. *Exopalaemon carinicauda* had the most abundant EST-SSR (868.02/Mb), whereas *Scylla paramamosain* had the least (286.48/Mb) in pleocyemata. *Penaeus monodon* had the most abundant EST-SSR (641.19/Mb), whereas *Litopenaeus setiferus* had the least (166.96/Mb) in dendrobranchiata. The abundance of EST-SSR with di-, tri-, and tetra-nucleotide motifs was more than that of those with penta- and hex- nucleotide motifs, which accounts for 41.11% in pleocyemata and 28.00% in dendrobranchiata. EST-SSR of compound (I) type occupied a large proportion in the pleocyemata (51.38%) and dendrobranchiata (65.13%). The frequency of the AC/GT repeat motif distribution was highest in dinucleotides, and ACC/GGT and AAT/ATT repeat motifs were the most abundant in the trinucleotide repeats in the pleocyemata. The frequency of AG/CT repeat motif distribution was highest in dinucleotides, and the distribution frequency of AAT/ATT motifs was significantly higher than other motifs of dinucleotide repeats in the dendrobranchiata. A total of 12,155 sequences containing SSRs were predicted; moreover, Gene Ontology (GO) Classification with the blast2go application was performed based on sequences containing SSRs of *Exopalaemon carinicauda*. The results demonstrated that ‘cellular process’ comprised the largest proportion in the biological process category, whereas ‘binding’ comprised the largest proportion in the molecular function category. Additionally, the cellular component category showed that many sequences likely possessed ‘cell parts’ and ‘cell’ by GO annotation. This study compared the characteristics of EST-SSR in different species of crustaceans and the diverse regions of the species genome. The consequences deepened our understanding of the distribution of SSRs and provided a reference for the development and practical applications of EST-SSR markers. The results also provided powerful information for future conservation and breeding research.

Key words Decapoda; Crustacean; EST-SSR

① Corresponding author: LI Jian, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180417002

http://www.yykxjz.cn/

刘冉阳, 史成银, 谢国驹, 李晨, 王海波. 真鲷虹彩病毒自然感染杂交石斑鱼“褐龙斑”的组织病理分析. 渔业科学进展, 2019, 40(3): 103–112

Liu RY, Shi CY, Xie GS, Li C, Wang HB. Histopathology of hybrid grouper (*Epinephelus bruneus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂) naturally infected with red seabream iridovirus (RSIV). Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(3): 103–112

真鲷虹彩病毒自然感染杂交石斑鱼 “褐龙斑”的组织病理分析*



刘冉阳^{1,2} 史成银^{1①} 谢国驹¹ 李晨¹ 王海波^{1,2}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 青岛 266071; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 褐龙斑是雌性褐石斑鱼(*Epinephelus bruneus*)和雄性鞍带石斑鱼(*E. lanceolatus*)杂交产生的子代。作为杂交石斑鱼的新品种,国内外尚没有褐龙斑疾病的报道。2017年7月,某养殖场褐龙斑出现急性死亡,10 d内累积死亡率高达80%。现场调查发现,病鱼外观无明显异常,但反应迟钝,伏底死亡。临床检查和剖检可见脾和肾严重肿大、易碎。组织病理切片观察发现,各组织中存在数量不等的嗜碱性、细胞质均一、直径为10~15 μm的肿大细胞。超薄组织切片中发现,肿大细胞胞质内存在大量直径为130~150 nm的虹彩病毒样颗粒。使用特异性的PCR引物,从病鱼脾、头肾等组织中均检测到真鲷虹彩病毒(Red seabream iridovirus, RSIV)的高强度感染。测定了该病毒主要衣壳蛋白(Major capsid protein, MCP)基因1362 bp的全长编码区,构建了19种(株)虹彩病毒系统发育树,结果显示,该病毒属于虹彩病毒科肿大细胞病毒属RSIV类群。本研究首次描述了褐龙斑虹彩病毒病的组织病理特征,揭示了褐龙斑是RSIV新的敏感宿主,为杂交石斑鱼病毒病的诊断与防治提供了重要的参考依据。

关键词 褐龙斑; 褐石斑鱼; 鞍带石斑鱼; 真鲷虹彩病毒; 组织病理

中图分类号 S943 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)03-0103-10

近年来,随着石斑鱼人工杂交苗种繁育技术的进步,且杂交子代存在明显的杂交优势,杂交石斑鱼逐渐成为市场的新宠(李炎璐等, 2015; 邵彦翔等, 2017)。褐龙斑是褐石斑鱼(*Epinephelus bruneus* ♀)与鞍带石斑鱼(*E. lanceolatus* ♂)的杂交子代,存在明显的杂交优势,是具有较大养殖潜力的石斑鱼新品种。

由于规模化养殖时间较短,目前国内外尚没有褐龙斑疾病的报道。2017年7月,山东省某养殖场褐龙斑出现急性、大量死亡。调查褐龙斑发病情况,取濒死鱼的组织进行电镜切片观察,在病鱼脾、肾等组织内发现大量的虹彩病毒样颗粒。

虹彩病毒是20面体状的大型DNA病毒,共分为

* 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2017HY-ZD0303)和农业国际交流与合作项目共同资助[This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2017HY-ZD0303), and Projects of International Exchange and Cooperation in Agriculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of China]. 刘冉阳, E-mail: biggerfish111@sina.com

① 通讯作者: 史成银, 研究员, E-mail: shicy@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-04-17, 收修改稿日期: 2018-05-03

5个病毒属,其中,肿大细胞病毒属(*Megalocytivirus*)的虹彩病毒是鱼类的重要病原之一(Jancovich *et al.*, 2012)。依据病毒的主要衣壳蛋白(Major capsid protein, MCP)基因,细胞肿大病毒属虹彩病毒可分类为3大类群(基因型),即主要感染海水鱼类的真鲷虹彩病毒(Red sea bream iridovirus, RSIV)类群、主要感染淡水鱼类的传染性脾肾坏死病毒(Infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV)类群和主要感染鲆鲽鱼类的大菱鲆红体病虹彩病毒(Turbot reddish body iridovirus, TRBIV)类群(Fu *et al.*, 2011; Kurita *et al.*, 2012)。真鲷虹彩病毒能导致多种鱼类发病死亡,严重威胁着世界鱼类养殖业的发展(Inouye *et al.*, 1992)。因此,真鲷虹彩病毒病长期以来被世界动物卫生组织(OIE)和中国列为鱼类重要疫病(Jung *et al.*, 2000; Rodge *et al.*, 1997; Weng *et al.*, 2002; Chua *et al.*, 1994)。

本研究通过疾病调查、病鱼的临床检查、组织病理和超微病理观察、病原初步筛查和分子生物学鉴定,确认感染褐龙斑的病毒为真鲷虹彩病毒,可为该病的深入研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

发病濒死和健康的褐龙斑均取自山东省某石斑鱼养殖场。TSA、TCBS培养基购自北京陆桥生物制品有限公司,海洋动物组织DNA提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,Ex *Taq* DNA聚合酶、dNTPs、DNA Marker购自TaKaRa公司;所用引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 疾病调查与临床检查

调查养殖环境及病鱼死亡情况;观察病鱼活动情况,对濒死病鱼进行观察和剖检。

1.3 组织病理及超微病理观察

参照史成银(2004)的方法,取濒死病鱼和健康鱼的肝、脾、肾、头肾、鳃、心脏、胃和肠道组织制成石蜡切片和超薄电镜切片,利用光学、透射电子显微镜观察拍照。

1.4 寄生虫观察和细菌分离

取濒死病鱼的鳃丝、体表黏液制成水浸压片,显微镜下观察。使用病鱼的肝、肾、脾接种TSA和TCBS平板后,28℃培养48h,观察细菌生长情况,进行细菌检测。

1.5 组织DNA提取和PCR检测

提取濒死病鱼脾、肝、头肾和肾组织的DNA,根据中华人民共和国出入境检验检疫行业标准《真鲷虹彩病毒病检疫技术规范》(SN/T 1675-2014),使用引物1-F/1-R和4-F/4-R进行PCR检测(表1)。50 μl的PCR反应体系:10×Reaction buffer(含20 mmol/L Mg²⁺) 5 μl, 2.5 mmol/L dNTPs 4 μl, 20 μmol/L引物各1 μl, 5 U/μl *Taq*酶1 μl, 100 ng/μl的模板DNA 4 μl,补足超纯水至50 μl。PCR反应程序:95℃预变性2 min; 94℃ 30 s, 58℃ 60 s, 72℃ 60 s,共进行30个循环;最后72℃延伸5 min。用10 g/L琼脂糖凝胶电泳观察结果。

表1 本研究中的PCR引物序列及其目标产物大小
Tab.1 Sequences of PCR primers and products length in this study

引物名称 Name of Primer	引物序列 Sequence of Primer (5'~3')	目标产物大小 Size of Amplicon (bp)
1-F	CTCAAACACTCTGGCTCATC	570
1-R	GCACCAACACATCTCCTATC	
4-F	CGGGGGCAATGACGACTACA	568
4-R	CCGCCTGTGCCTTTTCTGGA	
MCP-iridoF	GTGCAGGTTTCCAGAAGA	1581
MCP-iridoR	CATGGTACGTAACGCATAG	

1.6 虹彩病毒MCP全长基因的扩增

参照史成银(2004),用引物MCP-iridoF和MCP-iridoR扩增MCP基因全长(表1)。50 μl的PCR反应体系:10×Reaction buffer(含20 mmol/L Mg²⁺) 5 μl, 2.5 mmol/L dNTPs 4 μl, 20 μmol/L引物各1 μl, 5 U/μl *Taq*酶1 μl, 100 ng/μl的模板DNA 4 μl,补足超纯水至50 μl。PCR反应程序:94℃预变性5 min; 94℃ 2 min, 57℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35个循环;最后,72℃延伸5 min。用10 g/L琼脂糖凝胶电泳检查结果。PCR产物由上海生工生物技术有限公司从两端单向测序,再拼接出完整的PCR产物序列,用Blast比对分析测序结果。

1.7 虹彩病毒的系统发育分析

依据Blast比对结果,选取18种(株)具有代表性的虹彩病毒,从GenBank下载各病毒的MCP基因全长序列,用MEGA 7.0构建虹彩病毒系统发育树,分析、鉴定感染褐龙斑的病毒在虹彩病毒科中的分类地

位。各病毒的名称及 GenBank 登录号为: ATV (NC_005832)、CIV (AF303741)、FLIV-JJY (AY633990)、FV3 (U36913)、GIV (AY666015)、IIV-3 (DQ643392)、ISKNV (NC_003494)、ISKNV SB04 (KY440040)、LCDV-1 (NC_001824)、LCDV-C (AY380826)、RSIV-1 (AB666328)、RSIV 2HSB (AB666318)、RSIV-8 (AB666335)、RSIV-9 (AB666336)、RSIV 10GG (AB666324)、RSIV Ehime-1 (AB080362)、RSIV TGA14 (AB666320)、TRBIV (GQ273492)。

2 结果

2.1 疾病调查与临床检查

褐龙斑以循环水工厂化养殖, 发病时的水温为

28℃、盐度为 31、pH 为 7.5、溶氧为 4.5 mg/L、养殖密度为 1000 尾/40 m³。发病初期, 病鱼活力明显下降。随病程发展, 病鱼反应迟钝、伏底, 并出现死亡。4 个发病池, 日死亡率约 10%, 10 d 内累积死亡率达 80%。

病鱼为 2 龄鱼, 全长为 29.5~31.5 cm, 体重约为 500 g。多数鱼体表未见明显异常, 个别鱼尾鳍有溃疡病灶。病鱼鳃丝鲜红, 无溃烂(图 1A)。解剖可见病鱼空肠空胃, 无明显发炎。肝局部出血, 呈现不均匀的颜色。脾和肾严重肿大、易碎, 肾脏色淡(图 1B)。

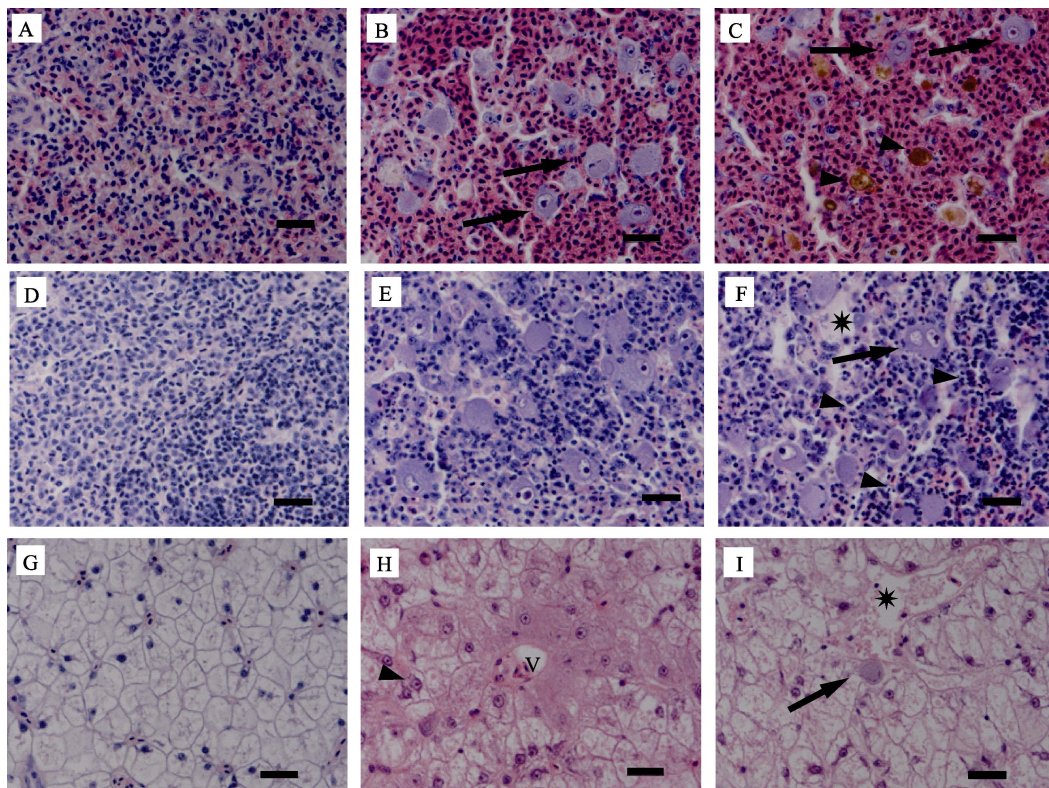
2.2 组织病理观察

健康鱼脾实质细胞饱满、清晰、排列紧密(图 2A)。病鱼脾组织细胞坏死, 被大量红细胞浸润, 出现严重



图 1 患病褐龙斑
Fig.1 Diseased fish

A: 病鱼外观无明显异常; B: 脾和肾严重肿大, 肾脏色淡
A: No obvious abnormality in the appearance; B: Swollen spleen and kidney, pale kidney



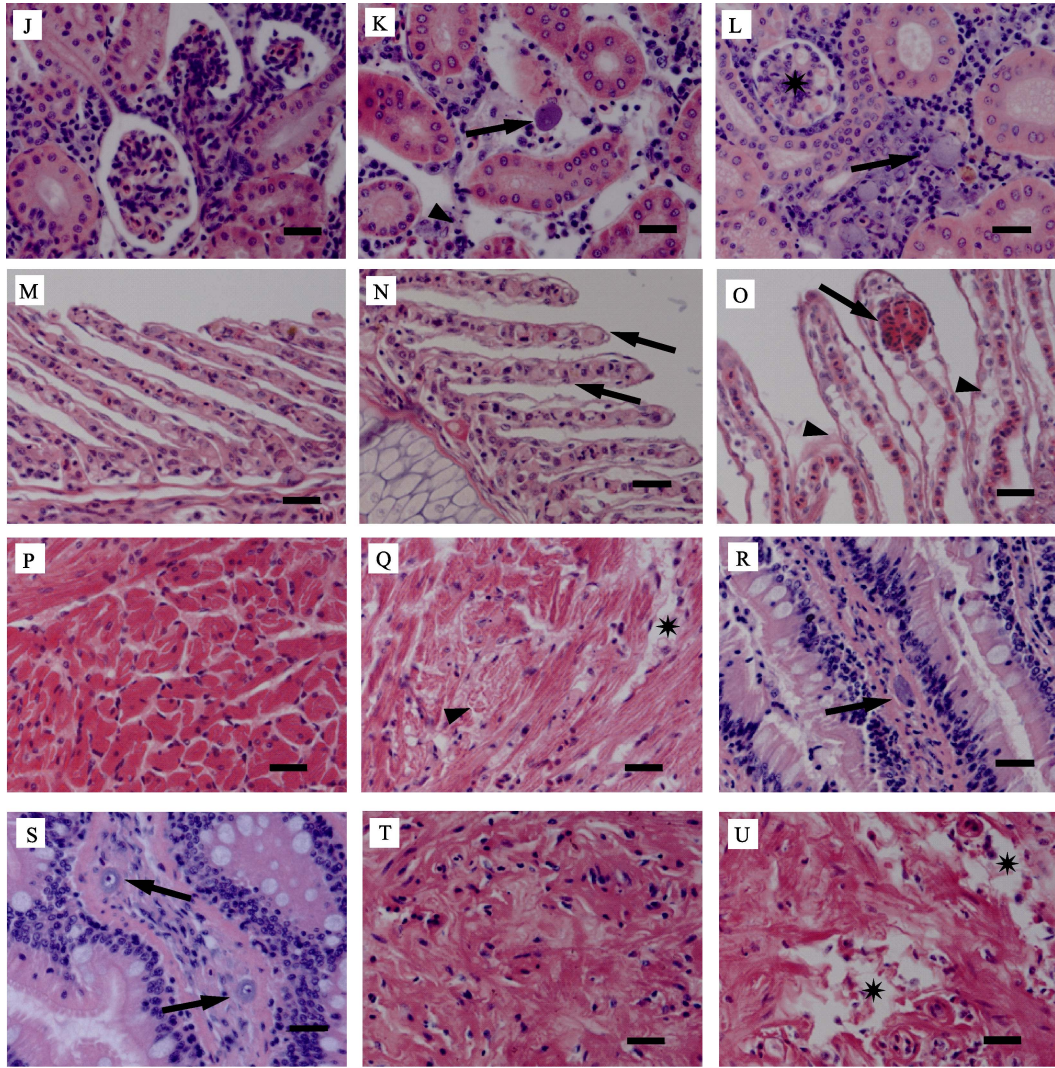


图2 患病鱼组织病理变化(标尺为 20 μm)

Fig.2 Histopathological changes in the diseased fish (Bar=20 μm)

A: 健康鱼脾组织; B: 病鱼脾脏组织中大量嗜碱性的肿大细胞(箭头); C: 病鱼脾脏内大量的血铁黄素沉积(三角箭头)
 D: 健康鱼头肾组织; E: 病鱼头肾组织中大量嗜碱性的肿大细胞; F: 病鱼头肾组织中出现局灶性坏死(星号), 细胞核固缩(三角箭头)和嗜碱性的肿大细胞(箭头); G: 健康鱼肝组织; H: 病鱼肝血窦(V)周围的细胞淀粉样变性, 出现双核假象(三角箭头); I: 病鱼肝脏局灶性坏死(星号)及零星出现的肿大细胞(箭头); J: 健康鱼肾组织; K: 病鱼肾造血组织坏死、细胞核固缩(三角箭头)并出现肿大细胞(箭头); L: 病鱼肾小球细胞空泡化(星号); M: 健康鱼鳃组织; N: 病鱼次级鳃丝肿胀(箭头); O: 病鱼次级鳃丝上皮细胞剥离(三角箭头), 柱细胞断裂致毛细血管扩张症(箭头); P: 健康鱼心组织; Q: 病鱼心肌退化变性(三角箭头)及坏死(星号); R、S: 病鱼肠粘膜固有层中零星出现的肿大细胞(箭头); T: 健康鱼胃组织; U: 病鱼胃组织退化变性、坏死(星号)

A: Spleen tissues of healthy fish; B: Enlarged cells with basophilic cytoplasm in the spleen of diseased fish (solid arrows); C: Hemosiderin deposition in the spleen of diseased fish (arrowheads); D: Head kidney tissues of healthy fish; E: Enlarged cells with basophilic cytoplasm in the head kidney of diseased fish; F: Localized necrosis (asterisk), karyopyknosis (arrowheads) and enlarged cells with basophilic cytoplasm (solid arrow) in the head kidney of diseased fish; G: Liver tissues of healthy fish; H: Amyloidosis of hepatocytes around the blood vessels (V) and false appearance of double nucleus (arrowhead) in the liver of diseased fish; I: Focal necrosis (asterisk) and scattered enlarged cell (solid arrow) in the liver of diseased fish; J: Kidney tissues of healthy fish; K: Hematopoietic necrosis, karyopyknosis (arrowhead) and enlarged cell (solid arrow) in the kidney of diseased fish; L: Hydropic degeneration of glomerulus (asterisk) in the kidney of diseased fish; M: Gill tissues of healthy fish; N: Oedema (solid arrows) of secondary lamellar in diseased fish; O: Exfoliation (arrowheads) and telangiectasis (arrow) of secondary lamellar in diseased fish; P: Heart tissues of healthy fish; Q: Myocardial degeneration (arrowhead) and necrosis (asterisk) of the heart in diseased fish; R and S: Scattered enlarged cells (solid arrows) in lamina propria of the intestine in diseased fish; T: Stomach tissues of healthy fish; U: Degeneration and necrosis of the stomach in diseased fish (asterisk)

淤血。组织中填充有大量嗜碱性的肿大细胞, 直径为 10~15 μm , 细胞质均一化(图 2B)。脾出现大量铁血黄素沉积(图 2C)。健康鱼的头肾呈致密的网状结构(图 2D)。病鱼的头肾组织中可见大量嗜碱性的肿大细胞(图 2E), 且组织结构松散, 大量细胞发生核固缩, 红细胞浸润, 多见细胞崩解后形成的坏死灶(图 2F)。健康鱼肝脏细胞大小、形状均一, 结构清晰排列紧密(图 2G)。病鱼肝脏细胞膜崩解, 边界模糊, 细胞连成一片, 造成双核假象; 细胞核肿大而核质溶解呈透亮状; 肝血窦周围细胞发生淀粉样变性, 胞质呈现云雾状的嗜酸性染色(图 2H)。病鱼肝脏内可见局灶性坏死, 并零星出现嗜碱性的肿大细胞(图 2I)。健康鱼的肾组织结构饱满、清晰(图 2J)。病鱼的肾造血组织坏死、细胞核固缩; 出现嗜碱性的肿大细胞, 但数量比脾和头肾组织中少。病鱼肾小管上皮细胞肿胀, 细胞核空泡化(图 2K)。肾小球血管球细胞水样变性, 肾小囊腔变窄(图 2L)。健康鱼鳃上皮细胞单层有序排列, 次级鳃丝结构清晰(图 2M)。病鱼鳃组织结构松散, 次级鳃丝肿胀(图 2N), 且上皮细胞剥离、脱落; 部分柱细胞断裂, 导致毛细血管扩张症(图 2O)。健康鱼心肌细胞结构清晰规整(图 2P)。病鱼心肌纤维结构松散、紊乱, 心肌退化变性, 胞质液化呈均质玻璃样物质。严重者心肌细胞坏死, 细胞崩解留下带状坏死灶(图 2Q)。病鱼肠组织病变不明显; 肠黏膜固有层零星出现细胞质均一、嗜碱性的肿大细胞, 细胞核固缩于细胞边缘, 或异常肿大, 核质溶解呈透亮状(图 2R、图 2S)。病鱼胃黏膜下层退化变性, 细胞出现坏死崩解, 留下不规则的坏死灶(图 2U)。

2.3 超微病理观察

透射电镜观察发现, 病鱼脾造血组织细胞核异染色质增多, 核膜可见但不清晰, 核周隙明显扩张, 严重者细胞核碎裂。细胞质中内质网囊泡化, 线粒体肿胀、嵴消失(图 3A)。肿大细胞胞质中存在大量虹彩病毒样病毒粒子, 无囊膜, 直径为 130~150 nm (图 3B)。病鱼头肾造血组织中发现含有大量病毒颗粒的肿大细胞, 且线粒体肿胀、嵴消失, 细胞质中囊泡增多; 特别是肿大细胞的细胞膜内陷形成大量树枝状沟回结构(图 3C)。出现核固缩的凋亡小体(图 3D)。病鱼肝细胞膜出现破损或结构异常, 核内大部分染色质溶解, 核外形可见, 粗面内质网囊泡化形成的小泡脱粒、破裂, 线粒体破损; 严重者细胞核消失, 出现嗜碱性髓鞘样小体, 胞内模糊不清, 结构基本消失(图 3E、图 3F)。病鱼肾小管上皮细胞核固缩或出现核沟, 细胞内出现初级溶酶体, 线粒体嵴肿胀呈管泡状, 刷状

缘发生断裂(图 3G)。肾造血组织肿大细胞的细胞膜内陷, 核形状异常, 核仁增大(图 3H)。病鱼次级鳃丝上皮细胞、柱状细胞病变严重。线粒体嵴肿胀、空泡化, 基质电子密度增大; 出现 S 或 Y 形的畸形线粒体, 以及大量纵向嵴线粒体; 细胞核周间隙扩张, 粗面内质网囊泡化并脱粒(图 3I、图 3J)。病鱼鳃血管及白细胞中观察到大量的病毒粒子(图 3K、图 3L), 表明病毒可经由血液循环感染鱼体各个组织。病鱼心肌细胞出现灶性溶解损伤, 可见大量初级溶酶体(图 3M)。血管及白细胞中可见零星的病毒粒子(图 3N、图 3O)。心肌细胞的线粒体损伤, 出现大量髓样体(图 3P)。还可见许多纵向嵴、嵴溶解和形状畸形的线粒体(图 3Q)。

2.4 寄生虫检查和细菌分离

所检患病褐龙斑均未观察到寄生虫。病鱼的肝、肾、脾接种的 TSA 和 TCBS 培养基上仅长出零星的菌落, 非细菌性疾病特征。经 16S rDNA 测序鉴定, 分别为哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、弧菌(*Vibrio spp.*)、美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damsela*)、假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas sp.*)、交替单胞菌(*Alteromonas sp.*)、亚硫酸盐杆菌(*Sulfobacter sp.*)等。

2.5 病鱼组织的 PCR 检测

3 尾病鱼的脾、头肾等组织, 用引物 1-F/1-R 和 4-F/4-R 进行 PCR 检测, 结果均为强阳性, 而健康褐龙斑未扩增出任何条带(图 4、图 5)。依据行业标准 SN/T 1675-2014, 可初步判定在褐龙斑各组织中发现的病毒为 RSIV。

2.6 感染褐龙斑的虹彩病毒分类鉴定

从病鱼脾组织中扩增得到了病毒(命名为 LZ170711 株)DNA 片段, 长度为 1581 bp。经 Blast 比对分析, 该序列包含 MCP 基因完整的编码区及其上游 57 个、下游 162 个核苷酸。其中, MCP 基因编码区全长为 1362 bp, 编码 453 个氨基酸。

与 GenBank 数据库中 18 种(株)虹彩病毒的相应序列进行比对发现, LZ170711 株与细胞肿大病毒属虹彩病毒各毒株相似性在 94% 以上; 而与蛙病毒属、淋巴囊肿病毒属、绿虹彩病毒属和虹彩病毒属虹彩病毒各毒株的相似性均在 55% 以下。在细胞肿大病毒属内, 与 RSIV 各分离株相似性均超过 97%, 与 ISKNV 和 TRBIV 的各分离株相似性为 94.5%~95.1%。LZ170711 与 RSIV TGA14、RSIV 10GG、RSIV-8、RSIV-9 的 MCP 基因序列完全一致, 与 RSIV

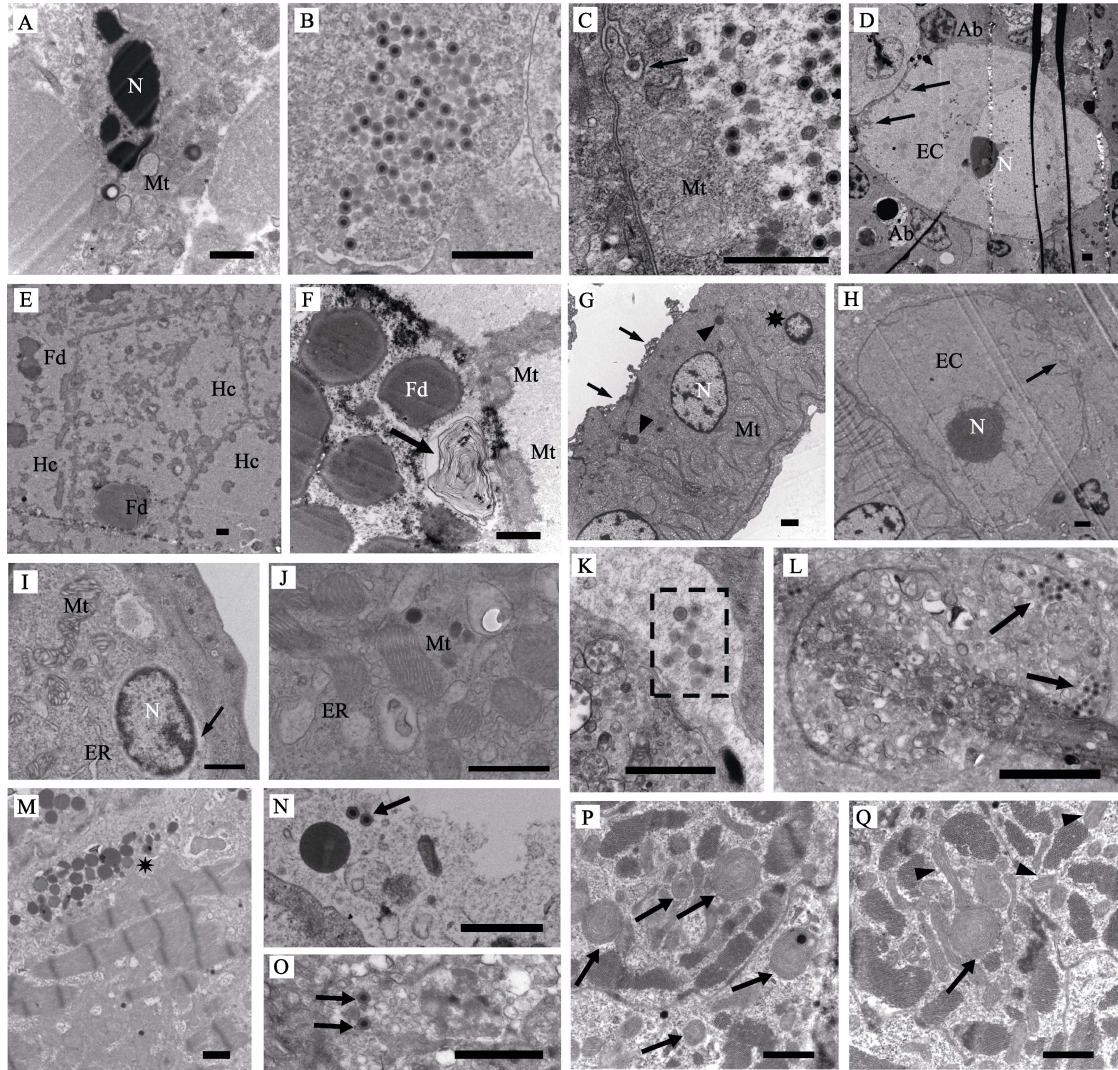


图3 病鱼的超微病理变化(标尺为1 μm)

Fig.3 Ultrastructural changes in the diseased fish (Bar=1 μm)

A: 破碎的细胞核(N)和肿胀的线粒体(Mt); B: 脾肿大细胞内大量的病毒粒子; C: 肿大细胞的线粒体(Mt)肿胀、细胞膜内陷(箭头); D: 肿大细胞(EC)的细胞膜内陷(箭头)、细胞核(N), 可见凋亡小体(Ab); E: 坏死的肝细胞(Hc); F: 肝脏细胞中髓鞘样小体(箭头)、脂肪滴(Fd)和线粒体(Mt); G: 肾小管上皮细胞核固缩(星号), 出现初级溶酶体(三角箭头), 线粒体(Mt)肿大, 刷状缘断裂(箭头); H: 肿大细胞(EC)肾脏中细胞的胞膜内陷(箭头), 细胞核(N)形状异常, 核仁增大, I: 鳃上皮细胞核(N)周隙扩大(箭头), 线粒体(Mt)、内质网(ER)肿大变形; J: 鳃细胞出现异常的纵向嵴线粒体(Mt); K: 鳃血管中的病毒粒子(虚框内); L: 鳃中白细胞内的病毒粒子(箭头); M: 心肌细胞出现大量初级溶酶体(星号); N: 心脏血管中的病毒粒子(箭头); O: 心脏中白细胞内的病毒粒子(箭头); P: 心脏细胞中髓样变性的线粒体(箭头); Q: 心脏细胞中髓样变性(箭头)、出现纵向嵴(三角箭头)的线粒体

A: Collapsed cell nucleus (N) and swollen mitochondria (Mt); B: Numerous viral particles in the cytoplasm of enlarged splenic cell; C: Swollen mitochondria (Mt) and invagination of cell membrane (solid arrow) in the enlarged cell of the head kidney; D: Invagination of cell membrane (solid arrows) in the enlarged cell of the head kidney (EC), nucleus (N), apoptotic body (Ab); E: Necrotic hepatocytes (Hc); F: Myelin figures in the cell of hepatocytes (solid arrow), fat droplet (Fd) and mitochondria (Mt); G: Karyopyknosis (asterisk), primary lysosomes (arrowheads), swollen mitochondria (Mt) and broken brush border (solid arrows) of renal tubular epithelial cells; H: Invagination of cell membrane (solid arrows) in the kidney cell, abnormal nucleus (N) and perinuclear space nucleolus in the enlarged cell (EC); I: Enlargement of nuclear gap in the gill epithelium (solid arrow), swelling deformation of mitochondria (Mt) and endoplasmic reticulum (ER) in gill epithelial cell; J: Abnormal mitochondria (Mt) with longitudinal cristae in the gill cells; K: Viral particles in vascular cavity of gill (dotted rectangle); L: Viral particles in leucocytes in the gill (solid arrows); M: Numerous primary lysosomes (asterisk) in myocardial cells; N: Scattered viral particles in vascular cavity of the heart (solid arrow); O: Viral particles in leucocytes of the heart (solid arrow); P: Myelin figures (solid arrows) of mitochondria in the heart cells; Q: Myelin figure (solid arrow) and longitudinal cristae (arrow heads) of mitochondria in the heart cells

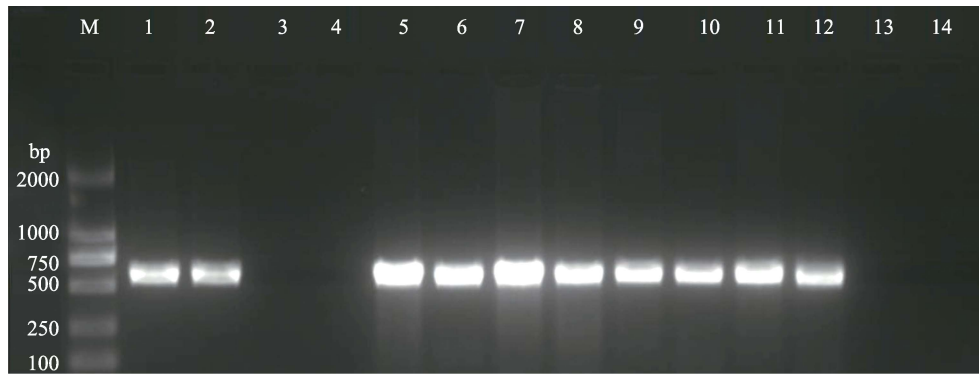


图 4 使用引物 1-F/1-R 检测患病和健康褐龙斑

Fig.4 PCR results of diseased and healthy fish using primer 1-F/1-R

M: DL2000 DNA Marker; 1~2: 阳性对照; 3~4: 阴性对照; 5~8: 1号病鱼的脾、肝、头肾和肾;
9~10: 2号病鱼的脾和肾; 11~12: 3号病鱼的脾和肾; 13~14: 健康鱼的脾和肾

M: DL2000 DNA Marker; 1~2: Positive control; 3~4: Negative control; 5~8: Sample from spleen, liver, head kidney and kidney of diseased fish #1; 9~10: Sample from spleen and kidney of diseased fish #2; 11~12: Sample from spleen and kidney of diseased fish #3; 13~14: Sample from spleen and kidney of healthy fish

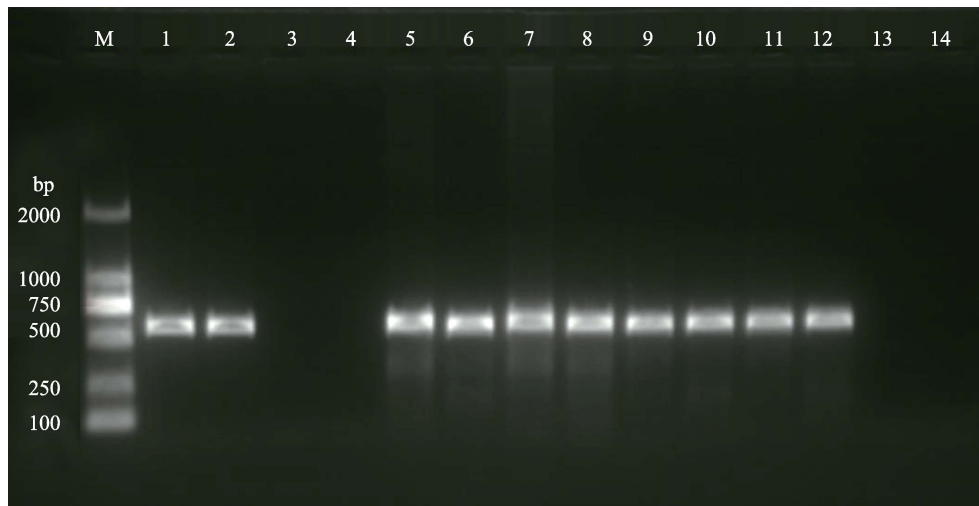


图 5 使用引物 4-F/4-R 检测患病和健康褐龙斑

Fig.5 PCR results of diseased and healthy fish using primer 4-F/4-R

M: DL2000 DNA Marker; 1~2: 阳性对照; 3~4: 阴性对照; 5~8: 1号病鱼的脾、肝、头肾和肾;
9~10: 2号病鱼的脾和肾; 11~12: 3号病鱼的脾和肾; 13~14: 健康鱼的脾和肾

M: DL2000 DNA Marker; 1~2: Positive control; 3~4: Negative control; 5~8: Sample from spleen, liver, head kidney and kidney of diseased fish #1; 9~10: Sample from spleen and kidney of diseased fish #2; 11~12: Sample from spleen and kidney of diseased fish #3; 13~14: Sample from spleen and kidney of healthy fish

Ehime-1、RSIV 2HSB 株有 9 个核苷酸的差异, 相似性为 97.9%。

依据上述结果,用 Mega 7 软件构建了包含 19 种(株)虹彩病毒的系统发育树(图 6)。从图 6 可以明显看出, 这些虹彩病毒分为 5 个病毒属, LZ170711 株位于细胞肿大病毒属内, 且与 RSIV 各分离株的关系最近。

3 讨论

鱼类感染了肿大细胞虹彩病毒后, 通常会体色变暗、游动异常、反应迟钝、嗜睡, 且出现脾、肾组织

肿大等症状(王庆等, 2010; 何建国等, 1998)。本研究发现, 患病褐龙斑反应迟钝, 脾、肾肿大, 且脾质地易碎。类似的病症在患病尖吻鲈(*Lates calcarifer*)和褐篮子鱼(*Siganus fuscescens*)中也有报道(文琳等, 2015; 雷燕等, 2014)。这些症状可用于肿大细胞虹彩病毒病的预警和初步诊断。

在组织病理方面, 观察到病鱼各组织中存在细胞变性、凋亡等由病毒感染引起的典型病变。病鱼脾和头肾是肿大细胞虹彩病毒的靶器官, 病理切片中可见大量嗜碱性、匀质化、直径为 15~20 μm 的肿大细胞,

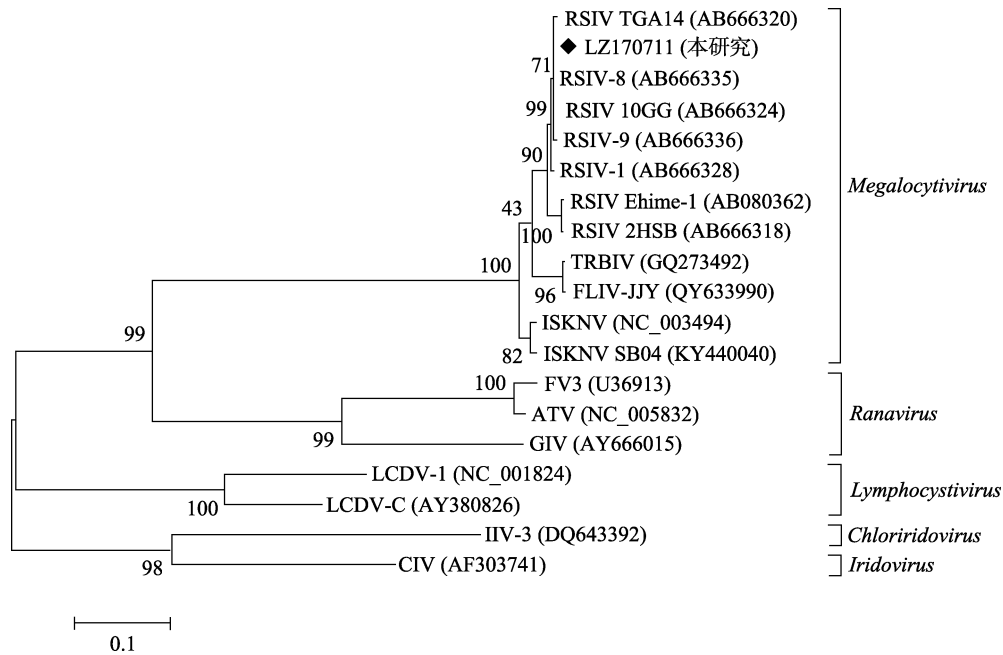


图 6 依据 *MCP* 基因构建的 19 种(株)虹彩病毒系统发育树

Fig.6 Phylogenetic tree of 19 iridovirus isolates (strains) based on the complete coding sequence of *MCP* gene

是该病的重要病理特征(Jancovich *et al.*, 2012)。通过超薄切片的电镜观察,在脾脏、头肾的肿大细胞中发现大量装配完成尚未释放的病毒粒子。令人感兴趣的是,在电镜超薄切片中,经常可以观察到肿大细胞的细胞膜具有大量的树枝状沟回结构,其形成原因和生理学意义尚不清楚,值得进一步研究。此外,在病鱼心脏和鳃的血管、白细胞内也发现了一定数量的病毒粒子,表明肿大细胞虹彩病毒可以通过血液循环在鱼体各器官和组织内扩散(秦蕾等, 2009)。尤其值得指出的是,一方面,本研究发现患病褐龙斑出现明显的心肌萎缩、断裂、间隙变大等病理特征,与此前报道的感染了虹彩病毒的条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)心脏病理特征一致(李华等, 2011)。另一方面,在超薄切片中观察到,病鱼心肌细胞的线粒体病变明显。大量的心肌细胞线粒体或出现纵向嵴,或退化同心圆状的髓样体,意味着其呼吸功能的严重丧失。综合上述病理特征,病鱼心脏出现了严重的病理损伤,影响了鱼体的血液循环,造成供氧不足,由此导致病鱼表现出游泳无力、反应迟钝、嗜睡等表现症状。

MCP 是虹彩病毒最主要的结构蛋白,其基因既高度保守,又有足够的变异性,可以充分反映虹彩病毒的演化关系,是虹彩病毒分类鉴定的重要依据(Inouye *et al.*, 1992; Chou *et al.*, 1998)。本研究测定并分析了感染褐龙斑的虹彩病毒的 *MCP* 基因,构建了虹彩病毒系统发育树,证实该病毒在分类地位上属于虹彩病毒科细胞肿大病毒属真鲷虹彩病毒类群。感染

褐龙斑的该病毒与感染真鲷(*Pagrus major*)的 RSIV-8、感染高体鲷(*Seriola dumerili*)的 RSIV-9、感染斜带石斑鱼(*E. coioides*)的 RSIV 10GG、感染褐点石斑鱼(*E. fuscoguttatus*)的 RSIV TGA14,其 *MCP* 基因编码区全序列完全一致,可以认为它们是同一种病毒。这表明 RSIV 的敏感宿主范围很广,其对多种海水鱼类均具有极强的致病性。RSIV 对褐龙斑的致病性此前未见有报道,有待深入研究。

参 考 文 献

- Chou HY, Hsu CC, Peng TY. Isolation and characterization of a pathogenic iridovirus from cultured grouper (*Epinephelus* sp.) in Taiwan. *Fish Pathology*, 1998, 33(4): 201-206
- Chua FHC, Ng ML, Woo JJ, *et al.* Investigation of outbreaks of a novel disease, 'Sleepy Grouper Disease', affecting the brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina* Forskal. *Journal of Fish Diseases*, 1994, 17(4): 417-427
- Fu X, Li N, Liu L, *et al.* Genotype and host range analysis of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV). *Virus Genes*, 2011, 42(1): 97-109
- He JG, Weng SP, Huang ZJ, *et al.* Identification of outbreak and infectious diseases pathogen of *Siniperca chuatsi*. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 1998, 37(5): 74-77 [何建国, 翁少萍, 黄志坚, 等. 鳊暴发流行病病毒性病原研究. 中山大学学报(自然科学版), 1998, 37(5): 74-77]
- Inouye K, Yamano K, Maeno Y, *et al.* Iridovirus infection of

- cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathology*, 1992, 27(1): 19–27
- Jancovich JK, Chinchar VG, Hyatt A, *et al.* Family Iridoviridae. In: *Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, 2012, 193–210
- Jung SJ, Oh MJ. Iridovirus-like infection associated with high mortalities of striped beakperch, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et Schlegel), in southern coastal areas of the Korean Peninsula. *Journal of Fish Diseases*, 2000, 23(3): 223–226
- Kurita J, Nakajima K. Megalocytiviruses. *Viruses*, 2012, 4(4): 521–538
- Lei Y, Qi RR, Tang SL, *et al.* Diagnosis of iridovirus disease in spinefoot *Siganus fuscescens*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2014, 29(3): 236–240 [雷燕, 戚瑞荣, 唐绍林, 等. 褐篮子鱼虹彩病毒病的诊断. 大连海洋大学学报, 2014, 29(3): 236–240]
- Li H, Sun ZP, Li Q, *et al.* Characterization of an iridovirus detected in rock bream (*Oplegnathus fasciatus*; Temminck and Schlegel). *Chinese Journal of Virology*, 2011, 27(2): 158–164 [李华, 孙志鹏, 李强, 等. 条石鲷检出的虹彩病毒特性研究. 病毒学报, 2011, 27(2): 158–164]
- Li YL, Chen C, Wang QY, *et al.* Comparative analysis of growth characteristics between hybrid F₁ by *Epinephelus moara* (♀) × *Epinephelus septemfasciatus* (♂) and the offspring of their parents. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(3): 42–49 [李炎璐, 陈超, 王清印, 等. 云纹石斑鱼(*E. moara*)(♀) × 七带石斑鱼(*E. septemfasciatus*)(♂)杂交 F₁ 生长特征与其亲本子代的比较. 渔业科学进展, 2015, 36(3): 42–49]
- Qin L, Wang YG, Shi CY, *et al.* Pathological study on the infection of *Scophthalmus maximus* by an iridovirus. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(5): 6–12 [秦蕾, 王印庚, 史成银, 等. 一种虹彩病毒感染大菱鲆的病理学研究. 渔业科学进展, 2009, 30(5): 6–12]
- Rodge HD, Kobs M, Macartney A, *et al.* Systemic iridovirus infection in freshwater angelfish, *Pterophyllum scalare* (Lichtenstein). *Journal of Fish Diseases*, 1997, 20(1): 69–72
- Shao YX, Chen C, Li YL, *et al.* Effects of low temperature stress on serum biochemical indices of the juvenile hybrid of *Epinephelus moara* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(2): 70–76 [邵彦翔, 陈超, 李炎璐, 等. 低温胁迫对云纹石斑鱼(♀) × 鞍带石斑鱼(♂)杂交后代血清生化指标的影响. 渔业科学进展, 2017, 38(2): 70–76]
- Shi CY. Studies on virial reddish body syndrome of farmed turbot *Scophthalmus maximus* in China. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2004 [史成银. 我国养殖大菱鲆病毒性红体病的研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2004]
- Wang Q, Zeng WW, Liu C, *et al.* Identification and characterization analysis on a megalocytivirus isolated from diseased marbled sleepy goby, *Oxyeleotris marmoratus*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, 34(6): 1150–1156 [王庆, 曾伟伟, 刘春, 等. 云斑尖塘鳢肿大细胞病毒属虹彩病毒的分离与鉴定. 水生生物学报, 2010, 34(6): 1150–1156]
- Wen L, Lei Y, Qi RR, *et al.* Diagnosis of iridovirus disease in sea bass *Lates calcarifer*. *Chinese Journal of Fisheries*, 2015, 28(4): 28–32 [文琳, 雷燕, 戚瑞荣, 等. 尖吻鲈 *Lates calcarifer* 虹彩病毒病的诊断. 水产学杂志, 2015, 28(4): 28–32]
- Weng SP, Wang YQ, He JG, *et al.* Outbreaks of an iridovirus in red drum, *Sciaenops ocellata* (L.), cultured in southern China. *Journal of Fish Diseases*, 2002, 25(11): 681–685

(编辑 马瑾艳)

Histopathology of Hybrid Grouper (*Epinephelus bruneus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂) Naturally Infected with Red Seabream Iridovirus (RSIV)

LIU Ranyang^{1,2}, SHI Chengyin^{1①}, XIE Guosi¹, LI Chen¹, WANG Haibo^{1,2}

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao); Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity, Qingdao 266071;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract “Helong grouper” is the hybrid progeny produced by female longtooth grouper (*Epinephelus bruneus*) and male giant grouper (*E. lanceolatus*). As a new breed of hybrid grouper, there is no report on the diseases of the Helong grouper, at home or abroad. In July 2017, the Helong grouper on a fish farm in Shandong Province suddenly died, and the cumulative mortality was as high as 80% within 10 d. A field survey found that the water temperature was 28°C and the salinity was 31 during epidemics. The appearance of diseased fish was normal. However, they were unresponsive, and died at the bottom of the tank. Clinical examination and necropsies revealed that the spleen and kidney of diseased fish were severely swollen and crispy. Histopathology studies indicated that tissues of diseased fish were severely damaged. A large number of basophilic, homogeneous cytoplasmic, swollen cells, with a diameter of 10~15 μm were observed in these tissues. In ultra-thin tissue sections of the spleen and head kidney, there are a large number of iridovirus-like particles, with a diameter of 130~150 nm in the cytoplasm of the swollen cells. Using specific PCR primers, severe infections of red sea bream iridovirus (RSIV) were detected in the spleen, head kidney, kidney, and liver tissues of diseased fish, which was consistent with electron microscopy observations. The complete coding sequence (CDS) of the major capsid protein (MCP) gene of the virus was 1362 bp in length. Based on the CDS of the MCP gene, a phylogenetic tree of 19 species (isolates) of the iridovirus was constructed. The tree showed that the iridovirus infecting the Helong grouper belongs to the RSIV cluster of the genus *Megalocytivirus*, family Iridovirus. This article describes for the first time the histopathological features of the iridoviral disease of the Helong grouper and confirmed that RSIV can naturally infect the hybrid grouper. This study not only revealed that the Helong grouper is a new susceptible host of RSIV, but also provided an important reference for the diagnosis and control of hybrid grouper viral disease.

Key words Helong grouper; *Epinephelus bruneus*; *E. lanceolatus*; Red seabream iridovirus (RSIV); Histopathology

① Corresponding author: SHI Chengyin, E-mail: shicy@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180502001

http://www.yykxjz.cn/

孙博超, 杨运楷, 李玉宏, 宋晓玲, 黄捷. 饲料中添加复合芽孢杆菌对凡纳滨对虾抗病毒感染能力及抗病基因表达的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(3): 113-121

Sun BC, Yang YK, Li YH, Song XL, Huang J. Effects of single or mixed *Bacillus* on WSSV infection and immune-related gene expression in *Litopenaeus vannamei*. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(3): 113-121

饲料中添加复合芽孢杆菌对凡纳滨对虾抗病毒感染能力及抗病基因表达的影响*



孙博超^{1,2} 杨运楷^{1,2} 李玉宏² 宋晓玲^{2①} 黄捷²

(1. 上海海洋大学 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 青岛 266071)

摘要 自健康凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)分离到枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)和短小芽孢杆菌(*B. pumilus*),将上述芽孢杆菌以单一和3株复合的方式包裹在基础饲料表面,制成益生菌饲料;每日投喂对虾,3周后进行白斑综合征病毒(WSSV)人工感染。统计实验组和对照组的累积死亡率,测定对虾肠道组织内WSSV拷贝数,分析对虾肠道组织含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶基因(*Caspase*)和硫氧还原蛋白基因(*Trx*)的相对表达量。结果显示,感染实验结束时,A组(枯草芽孢杆菌)、B组(地衣芽孢杆菌)、C组(短小芽孢杆菌)和D组(枯草芽孢杆菌+地衣芽孢杆菌+短小芽孢杆菌复合益生菌)的对虾累积死亡率分别为(73.3±7.0)%、(63.3±5.5)%、(75.0±7.9)%和(50.0±5.3)%,显著低于对照组(PBS组)(100%);在整个感染阶段,各实验组的病毒拷贝数呈先上升后下降的趋势,但对照组呈现一直上升趋势,且显著高于实验组。抗病基因表达结果显示,WSSV感染后,各组对虾肠道*Caspase*相对表达量随感染时间的延长呈先上调再下调的趋势,且在18h各组对虾肠道*Caspase*表达量达到最大值;益生菌摄取和WSSV感染都能刺激*Trx*的表达,益生菌的刺激相对平缓,且各实验组对虾肠道*Trx*相对表达量在WSSV感染后的18h时陡升到最大值,极显著高于对照组,且以D组的激活能力最强。研究证实,枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和短小芽孢杆菌均可提高对虾抗WSSV感染能力,复合芽孢杆菌抗病毒能力最突出。对虾抗病力的提高可能与芽孢杆菌减缓了病毒在靶组织的增殖速率、提高了*Caspase*和*Trx*基因表达水平相关。

关键词 凡纳滨对虾;芽孢杆菌;WSSV;天冬氨酸蛋白酶基因;硫氧还原蛋白基因;定量PCR
中图分类号 S945.1 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2019)03-0113-09

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)是中国主要的对虾养殖品种,2016年全国的凡纳滨对虾海水

* 中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2016HY-ZD0401)和现代农业产业技术体系专项资金(CARS-47)共同资助 [This work was supported by the Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Chinese Academy of Fishery Sciences (2016HY-ZD0401), and China Agriculture Research System (CARS-47)]. 孙博超, E-mail: 921008365@qq.com

① 通讯作者: 宋晓玲, 研究员, E-mail: songxl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-05-02, 收修改稿日期: 2018-05-30

养殖总产量为 167.2 万 t, 占对虾类养殖产量的 91% (中国渔业统计年鉴, 2017)。高密度集约化养殖是凡纳滨对虾养殖的主要模式, 随着集约化养殖模式的剧增, 对虾养殖生产的病害问题日益严重, 先后有白斑综合征(White spot disease, WSD)、急性肝胰腺坏死病(Acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)、偷死野田村病(Covert mortality nodavirus disease, CMNVD)、虾肝肠胞虫病(*Enterocytozoon hepatopenaei* disease, EHP)等疫病发生与流行(Flegel, 1997; Zhang *et al.*, 2016; 中国水生动物卫生状况报告, 2016)。

益生菌作为养殖对虾病害生物防控的重要手段, 已经在拮抗细菌或抗病毒感染方面展示出了较好的保护效果, 国内外水产养殖使用较多的益生菌是光合细菌和芽孢杆菌(Ninawe *et al.*, 2009; Wen *et al.*, 2015; 杜佗等, 2017)。芽孢杆菌不仅可以改善肠道微生物生态平衡、促进对虾对饲料的消化和吸收能力、提高对虾免疫和抗逆水平, 还可以抑制养殖水体和肠道病原微生物的生长和繁殖、提高对虾抗病力(孙艳等, 2012; Lakshmi *et al.*, 2013; Zokaefar *et al.*, 2014)。但目前研究与应用的多为单一芽孢杆菌, 多种类的芽孢杆菌混合使用还鲜有报道(Ravi *et al.*, 2007; Sánchez-Ortiz *et al.*, 2016)。

本研究以枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)和短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)为候选益生菌, 采用投喂单一和复合配伍形式包裹饲料免疫凡纳滨对虾, 3 周后进行白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)人工感染实验, 统计实验组和对照组的累积死亡率, 验证复合芽孢杆菌对凡纳滨对虾抗病毒能力的影响; 并通过荧光定量 PCR 技术分析各实验组和对照组对虾组织病毒拷贝数变化, 以及含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶(CysteinyI aspartate specific proteinase, Caspase)基因和硫氧还原蛋白(Thioredoxin, Trx)基因在免疫阶段和 WSSV 感染阶段的相对表达情况, 用于探究益生菌提高对虾抗病能力的机制。

1 材料与方法

1.1 对虾与菌种

1.1.1 对虾 实验用凡纳滨对虾购自山东省海阳市某对虾养殖场[生长环境盐度为 20 ± 1 、温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$], 对虾进入实验室前先行采样, 确认 WSSV、CMNV 等主要对虾病原检测阴性。购买的对虾在实验室养殖条件下暂养 1 周左右, 使其适应实验室养殖环境, 暂养期间投喂商品饲料, 定期处理残饵和更换养殖

水体。

1.1.2 菌种及培养 短小芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌均分离于健康凡纳滨对虾肠道, 纯化后经 16S rDNA 序列分析及 Biolog 碳源利用等生理生化特征分析完成菌株鉴定, 并于 -80°C 保存。菌种活化后经发酵罐发酵培养, 离心收集菌体, 短小芽孢杆菌活菌量达到 $(1\sim 2) \times 10^{11}$ CFU/ml, 地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌活菌数量达到 $(1\sim 2) \times 10^{12}$ CFU/ml。

1.2 饲料制备

实验全过程选用大海跃牌饲料作为基础饲料。免疫饲料按一定比例将菌液与无菌 PBS 混合后, 喷洒在基础饲料上, 混合均匀, 阴干后于 -4°C 冰箱中保存。每周涂布含益生菌的饲料于固体 2216E 培养基中, 检测饲料中的细菌数是否达到所需菌种浓度。基础饲料喷洒等量 PBS 为空白对照。

1.3 实验分组

将暂养稳定后的凡纳滨对虾随机挑取个体均匀、活力较强的 1200 尾分配在整理箱中。共 5 组, 每组 6 个重复, 每个重复 40 尾对虾。5 组分别投喂不同饲料: A 组含枯草芽孢杆菌活菌 $(1\sim 2) \times 10^7$ CFU/g, B 组含地衣芽孢杆菌活菌 $(1\sim 2) \times 10^7$ CFU/g, C 组含短小芽孢杆菌活菌 $(1\sim 2) \times 10^7$ CFU/g, D 组含枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和短小芽孢杆菌的等量混合活菌 $(1\sim 2) \times 10^7$ CFU/g, PBS 组为投喂不含益生菌的基础饲料的对照组。实验期间, 各实验组和对照组每日投喂 3 次相应饲料, 日投喂量为凡纳滨对虾体重的 10% (依据对虾摄食情况做适量调整), 并按相同条件进行养殖管理。

1.4 WSSV 感染实验

将实验室保存的感染 WSSV 的螯虾去除肝胰腺的头胸组织, 加入适量 4°C 预冷的 PBS, 20000 r/min 冰浴匀浆; 匀浆液 4°C 、3000 g 离心 10 min, 上清液 4°C 反复离心 3 次(4000 g, 6000 g, 8000 g 各 10 min); 上清液经 400 目筛绢过滤除去杂质后, 用 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤除细菌, 分装保存于 -80°C 。制备的病毒粗提液浓度为 0.16 g/ml, 注射感染前进行预实验, 确定最适感染剂量为 50 μl /尾。

在免疫 21 d 后, 从各实验组和对照组中随机挑取 240 尾对虾进行感染实验, 每组 6 个重复, 每个重复 40 尾对虾。其中, 3 个重复用于统计累积死亡率, 3 个重复用于采样。感染前 1 d 停止投喂饲料, 次日, 于每尾对虾第 2 腹节注射 WSSV 粗提液 50 μl , 以 PBS 溶液为阴性对照组。攻毒后, 实验组和对照组依然投

喂相应饲料。每天及时检出死亡或濒死对虾,记录死亡数量,14 d后结束感染实验。

1.5 样品采集与处理

免疫期间的样品采集与处理:实验开始前取样作为0 h,免疫实验开始后分别在1、3、7和15 d随机采集对照组(PBS)和实验组(A、B、C、D组)对虾。无菌操作取出对虾肠道放于1.5 ml无RNase离心管中,于-80℃超低温冰箱中保存。

感染期间的样品采集与处理:感染实验开始前,取样作为0 h,攻毒实验开始后,分别在6、18、96和192 h随机采集对照组和实验组(A、B、C、D组)对虾。分别无菌操作采集对虾鳃和肠道置于1.5 ml无RNase离心管中,于-80℃超低温冰箱中保存。

1.6 RNA提取

利用总RNA提取试剂盒(TaKaRa)提取RNA,方法参考使用说明书。用NanoDrop 2000c (Thermo)测定RNA OD_{260 nm}/OD_{280 nm}值,进行定量测定,分装保存于-80℃备用。进行反转录前,去除总RNA中残留的基因组DNA。

1.7 cDNA合成

使用Prime Script RT reagent Kit With gDNA Eraser试剂盒(TaKaRa)进行cDNA合成,在20 μl反应体系中加入1 μl(≤1 μg/μl)的总RNA,4 μl 5×PrimeScript Buffer 2,1 μl Prime Script Mix,10 μl基因组DNA去除反应液,4 μl无RNase水,37℃孵育15 min。85℃加热5 s,合成cDNA模板。

1.8 病毒定量检测

1.8.1 检测引物 病毒定量检测引物见程晓艳等

(2010), WSSV-FP(CTCTTGTGGTTCATCAGGGGC); WSSV-RP(CTGGATTTCTCTCAGGGTCTTTAGT)。

1.8.2 标准品制备 制备含有WSSV目的扩增片段的质粒作为标准品。按照世界动物卫生组织(OIE)《水生动物疫病诊断手册》对WSSV进行PCR扩增,得到256 bp的扩增产物。将扩增产物连接到pMD18-T载体,转化到大肠杆菌DH5α,构建重组质粒,在LB培养基(含100 μg/ml氨苄青霉素)上增殖,提取质粒DNA,用NanoDrop 2000c (Thermo)测定质粒DNA的浓度,每对碱基的平均分子量为649 g/mol,再根据阿佛加德罗常数 6.02×10^{23} ,计算出标准品的拷贝数为 8×10^{11} copies/μl。按照100倍稀释梯度,绘制标准曲线。

1.8.3 WSSV绝对定量 实时荧光定量PCR反应体系:Real-time PCR按TransStart Top Green qPCR Super Mix试剂盒(Trans Gen Biotech)说明书进行,反应体系为25 μl:DNA模板1 μl(10~20 ng/μl),总量为200~400 ng;正、反向引物各0.5 μl(10 μmol/L),总量为5 pmol;2×TransStart™ Green qPCR Super Mix 12.5 μl;1×Passive Reference Dye 0.5 μl;无RNase水9 μl。每组设3个平行,无RNase水作为阴性对照。扩增程序:94℃预变性5 min,1个循环;94℃预变性30 s,61℃退火30 s,72℃延伸30 s,40个循环,并且在此步72℃时收集荧光,72℃延伸10 min。

1.9 抗病毒相关基因表达量的定量检测

1.9.1 引物 参照GenBank中凡纳滨对虾相应序列,利用Primer Premier 5.0进行目的基因*Caspase*和*Trx*的引物设计,引物序列见表1,内参基因与目的基因在扩增时加入等量模板,扩增后熔解曲线无非特异性扩增。

表1 Real-time PCR引物序列
Tab.1 Primer used for real-time PCR

目的基因 Target gene	序列号 GenBank No.	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
<i>EF-α</i>	GU136229.1	ATGTCAGCACGGCAAAA	AAAGATGGTTCCCAGCAAGC
<i>Caspase-3</i>	EU421939.1	CGGGTAGGAAGCCCACATATCAA	ACGGCGAAGTCAAAGCCAGAA
<i>Trx</i>	EU499301.1	TTAACGAGGCTGGAAACA	AACGACATCGCTCATAGA

1.9.2 实时荧光定量PCR反应体系和程序 依据SYBR Premix Ex Taq™ II试剂盒(TaKaRa)配制25 μl反应体系:2×SYBR Premix Ex Taq™ II 12.5 μl,正、反向引物各10 μmol/L 2 μl,DNA模板1 μl(≤100 ng),无RNase水9.5 μl;于Rotor Gene3000 (Corbett, 澳大利亚)进行实时荧光定量PCR,反应程序:95℃预变性

10 min,1个循环;95℃预变性5 s、60℃退火(由每个基因确定)20 s、72℃延伸20 s,45个循环。

1.9.3 熔解曲线测定 实时荧光定量PCR反应完成后,在Rotor Gene 3000中每完成1个循环进行1次信息采集。采用Rotor-Gene Analysis Software 6.0进行分析,2种免疫相关基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$

法来进行计算(Livak *et al.*, 2001)。

1.10 统计分析

本研究所有数据均采用 SPSS16.0 统计软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 若出现显著差异时($P<0.05$, $P<0.01$), 用 LSD 法做多重比较。

2 结果与分析

2.1 益生菌对凡纳滨对虾感染 WSSV 后累积死亡率的影响

凡纳滨对虾感染 WSSV 后 14 d 内的累积死亡率统计结果见表 2, 由表 2 可知, 枯草芽孢杆菌+地衣芽孢杆菌+短小芽孢杆菌复合益生菌组(D 组)到感染实验结束时, 对虾累积死亡率最低, 只有(50.0±5.3)%; 其次为地衣芽孢杆菌组(B 组), 对虾累积死亡率为(63.3±5.5)%; 投喂含枯草芽孢杆菌和短小芽孢杆菌饲料实验组(A 组和 C 组)对虾的累积死亡率分别为(73.3±7.0)%和(75.0±7.9)%; 对照组(PBS 组)对虾的累积死亡率为 100%, 显著高于各实验组的累积死亡率。

表 2 口服不同益生菌包裹饲料的凡纳滨对虾感染 WSSV 后的累积死亡率

Tab.2 Cumulative mortality of *L. vannamei* fed with different probiotic preparations after injection with WSSV

组别 Group	感染后时间 Time post injection (d)										
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
A	12.5±1.9	29.2±6.9	37.5±5.0	50.8±3.8	59.2±6.9	65.8±10.1	68.3±7.0	70.8±7.0	71.7±6.7	72.5±6.7	73.3±7.0
B	8.3±2.3	15.8±5.1	20.8±2.5	29.2±1.9	31.7±3.9	50.0±3.3	53.3±4.3	58.3±5.7	59.2±6.0	61.7±7.5	63.3±5.5
C	9.2±0.7	20.0±3.0	30.0±5.0	47.5±5.7	53.3±7.1	68.3±5.1	72.5±3.3	72.5±3.3	74.2±0.2	75.0±7.9	75.0±7.9
D	10.0±2.4	16.7±2.3	22.2±3.8	26.7±0.2	30.0±2.6	40.0±2.3	43.3±4.7	46.7±9.4	48.9±7.1	50.0±5.3	50.0±5.3
PBS	5.8±1.7	22.5±2.5	37.5±4.7	57.5±5.1	67.5±10.0	80.8±6.7	88.3±7.6	95.8±5.0	100±0	100±0	100±0

注: A: 枯草芽孢杆菌组; B: 地衣芽孢杆菌组; C: 短小芽孢杆菌组; D: 复合芽孢杆菌组(枯草芽孢杆菌、短小芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌); PBS: 对照组

Note: A: *B. subtilis* group, B: *B. licheniformis* group, C: *B. pumilus* group, D: Mixed *Bacillus* group, PBS: Control group

2.3 Caspase 基因在免疫期间和 WSSV 感染期间的相对表达

2.3.1 免疫期间凡纳滨对虾肠道中 Caspase 基因表达

通过荧光定量 PCR 技术测定了对虾肠道 Caspase 基因在免疫期间的相对表达量, 结果显示, 免疫期间实验组 Caspase 基因相对表达量在第 1 天上调明显, 随后其相对表达量随着免疫时间的延长逐渐恢复到正常水平, 各时间节点 Caspase 基因相对表达量差异不显著(图 2)。

2.3.2 WSSV 攻毒后凡纳滨对虾肠道中 Caspase 基因表达 通过荧光定量 PCR 技术测定了对虾肠道 Caspase 基因在 WSSV 感染后的相对表达量, 结果显示, WSSV 感染后各组对虾肠道 Caspase 相对表达量

2.2 WSSV 攻毒后各实验组凡纳滨对虾鳃组织中病毒拷贝数的变化情况

利用绝对定量 PCR 技术, 测定了凡纳滨对虾感染 WSSV 后在不同感染时间段的鳃组织病毒拷贝数(图 1)。在整个感染阶段, 各实验组的病毒拷贝数呈先上升后下降趋势, 但对照组病毒拷贝数一直呈现上升趋势, 且病毒拷贝数均高于实验组, 差异显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)。病毒感染 6 h 后, 对虾鳃组织的病毒拷贝数达到 $2.73 \times 10^5 \sim 1.59 \times 10^6$ copies/ μ l, 对照组最高, 与 A、B 组差异显著, 与 C、D 组差异极显著; 18 h 各组对虾鳃组织的病毒拷贝数继续增加, 对照组最高, 与 A、B 组差异显著, 与 C、D 组差异极显著; 到 96 h 各组的病毒拷贝数均达到最大值, 对照组最高, 与 B 组差异显著, 与 A、C 和 D 组差异极显著; 192 h 对照组病毒拷贝数略下降, 实验组下降更加突出, D 组最低, 为 1.69×10^5 copies/ μ l, 对照组与实验组间差异极显著。此结果证实, 饲料中添加益生菌, 在一定程度上能延缓病毒复制速度, 降低病毒拷贝数, 复合益生菌组延缓病毒复制效果更佳。

随感染时间的延长呈先上调再下调的趋势, 且在 18 h 各组对虾肠道 Caspase 表达量达到最大值。在 6 h 时, 复合芽孢杆菌组的对虾肠道 Caspase 表达量极显著高于对照组, 地衣芽孢杆菌的对虾肠道 Caspase 表达量显著高于对照组; 18 h 时, 所有实验组的对虾肠道 Caspase 表达量均极显著高于对照组, 而 96 h 时, 只有复合芽孢杆菌组的对虾肠道 Caspase 表达量显著高于对照组(图 3)。

2.4 Trx 基因在免疫期间和 WSSV 感染期间的相对表达

2.4.1 免疫期间凡纳滨对虾肠道中的 Trx 基因表达

通过荧光定量 PCR 技术测定了对虾肠道 Trx 基

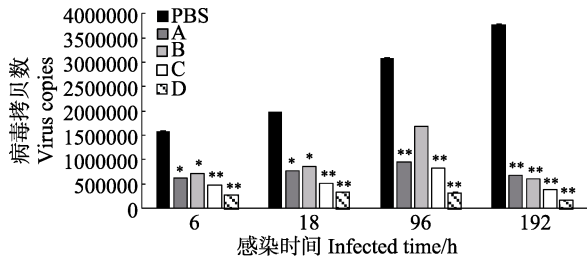


图 1 凡纳滨对虾感染 WSSV 后鳃组织内病毒拷贝数
Fig.1 The virus copies in gill of *L. vannamei* during WSSV infection

A: 枯草芽孢杆菌组; B: 地衣芽孢杆菌组; C: 短小芽孢杆菌组; D: 复合芽孢杆菌组(枯草芽孢杆菌、短小芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌); PBS 组: 对照组。*表示差异显著 ($P < 0.05$), **表示差异极显著 ($P < 0.01$)。下同
A: *B. subtilis* group, B: *B. licheniformis* group, C: *B. pumilus* group, D: Mixed *Bacillus* group, PBS: Control group. * denote significant difference ($P < 0.05$), **denote highly significant difference ($P < 0.01$). The same as below

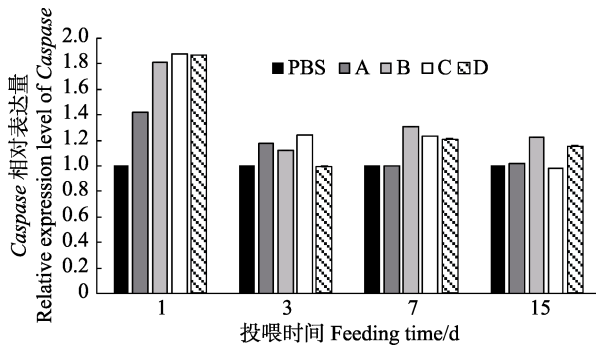


图 2 益生菌包裹饲料投喂期间对虾肠道中免疫基因 *Caspase* 的相对表达量

Fig.2 Relative expression of immune gene *Caspase* in the gut of *L. vannamei* fed with different probiotic preparations

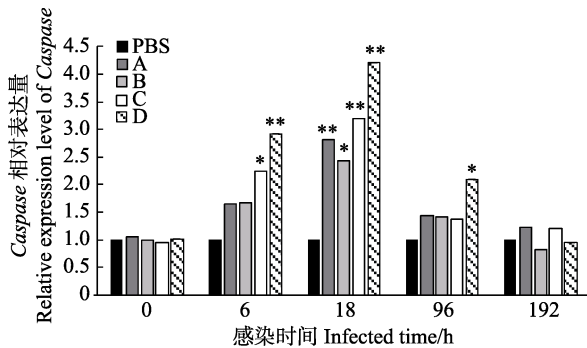


图 3 WSSV 攻毒后各组对虾肠道中免疫基因 *Caspase* 的相对表达量

Fig.3 Relative expression of immune gene *Caspase* in the gut of *L. vannamei* fed with different probiotic preparations during WSSV infection

因在免疫期间的相对表达量, 结果显示, 各实验组 *Trx* 相对表达量在整个免疫期间均呈现上调趋势, 且

以第 1 天值最高, 各实验组对虾肠道中 *Trx* 基因相对表达量均极显著高于对照组, 其中, 复合芽孢杆菌组表达量最高。第 3 天, 对虾肠道中 *Trx* 基因相对表达量略有下降, A、B 组显著高于对照组, C、D 组极显著高于对照组; 第 7 天又有所下降, C 组显著高于对照组, D 组极显著高于对照组; 到第 15 天, 只有 C 组显著高于对照组(图 4)。

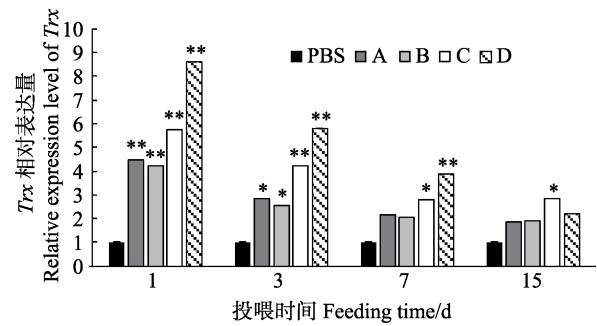


图 4 益生菌包裹饲料投喂期间对虾肠道中免疫基因 *Trx* 的相对表达量

Fig.4 Relative expression of immune genes *Trx* in the gut of *L. vannamei* fed with different probiotic preparations

2.4.2 WSSV 攻毒后凡纳滨对虾肠道中的 *Trx* 基因表达 通过荧光定量 PCR 技术测定了对虾肠道 *Trx* 基因在 WSSV 感染后的相对表达量, 结果显示, WSSV 感染后, 各实验组对虾肠道 *Trx* 相对表达量在 6 h 内没有变化, 18 h 时, 陡升到最大值, 且极显著高于对照组; 96 h 时, 复合芽孢杆菌组的对虾肠道 *Trx* 表达量极显著高于对照组, 其余 3 个实验组显著高于对照组; 到 192 h 时, 3 个实验组的对虾肠道 *Trx* 表达量仍显著高于对照组(图 5)。

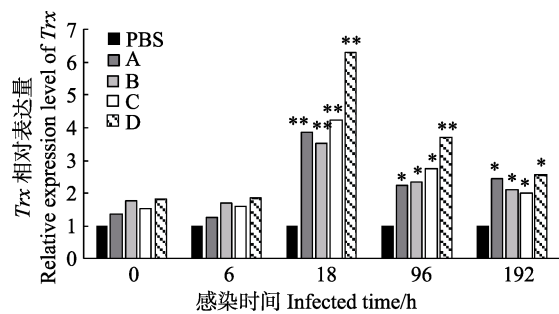


图 5 WSSV 攻毒后各组对虾肠道中 *Trx* 基因的相对表达量
Fig.5 Relative expression of immune gene *Trx* in the gut of *L. vannamei* fed with different probiotic preparations during WSSV infection

3 讨论

枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和短小芽孢杆菌普遍存在于土壤及植物体表, 是人、动物肠道内常见的

共生菌。它们均在 1989 年美国食品药品监督管理局(FDA)和美国饲料公定协会(AAFCO)公布的 44 种“可直接饲喂且通常认为是安全的微生物”范围之内,也属于 2008 年 12 月中国农业部 1126 号公告《饲料添加剂品种目录》中规定的 16 种可以直接饲喂动物的饲料级微生物添加剂菌种。芽孢杆菌和双歧杆菌、乳酸菌等传统益生菌相比,具有营养体-芽孢-营养体的独特生活史周期,抗逆能力强、繁殖速度快、营养要求简单,具有可抵抗酸、高温、干燥等不良环境条件等优势,适宜大规模产业化发酵生产。芽孢杆菌作为饲料微生物可以 100%活菌状态到达肠道,因此,以饲料添加剂方式在水产动物养殖生产中有很好的应用前景(Ninawe *et al.*, 2009; Lakshmi *et al.*, 2013)。

对虾肠道中存在着大量微生物,仅可培养细菌其总数通常在 $10^6 \sim 10^9$ CFU/g 之间,弧菌属(*Vibrio* sp.)、乳球菌属(*Lactococcus* sp.)、芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)、葡萄球菌属(*Staphylococcus* sp.)、希瓦氏菌属(*Shewanella* sp.)、节杆菌属(*Arthrobacter* sp.)、发光杆菌属(*Photobacterium* sp.)、微小杆菌属(*Microbacterium* sp.)等为对虾肠道的主要(可培养)优势菌(张盛静等, 2015)。复合益生菌制剂突破了单一益生菌的局限,能够相互协调作用,发挥更好效果(刘淑兰等, 2017)。Salinas 等(2005)应用枯草芽孢杆菌和乳酸菌以复合和单一添加形式投喂金头鲷(*Sparus aurata*),结果显示,复合菌比单一菌有更好的效果,认为不同细菌在肠道微生物环境所处生态位不同,因而复合菌比单一菌组免疫力高。Ravi 等(2007)在斑节对虾(*Penaeus monodon*)幼体养殖期间,向养殖水体中添加芽孢杆菌可以有效地抑制水体中如副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)等致病菌的生长,并可以显著地降低死亡率。Sánchez-Ortiz 等(2016)报道,将从毛蚶(*Anadara tuberculosa*)中分离的地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌混合到饲料中投喂凡纳滨对虾,结果降低了 WSSV 和传染性皮下和造血组织坏死病毒(IHHNV)感染后的死亡率,增强了对虾的免疫相关基因表达。本研究选用的芽孢杆菌均分离自健康对虾肠道,以单独和复合的方式添加到对虾饲料中,饲喂 21 d 后,通过 WSSV 感染实验来验证其抗病效果。结果证实,饲料中添加单一或复合芽孢杆菌均可提高凡纳滨对虾的抗 WSSV 感染能力,以复合芽孢杆菌抗病毒能力最显著。WSSV 感染后的几个时间节点对虾鳃组织中病毒拷贝数与对虾累积死亡率的结果相吻合,证实芽孢杆菌进入对虾消化道通过某种或多种机制间接影响了病毒在对虾体内的复制和增殖,或是提高了对虾对病毒的清除作用。高剂量

投入益生菌可在环境中形成优势菌群,一方面抑制其他病原微生物的繁殖,将继续性感染控制在较低水平;另一方面当环境遭遇病原微生物侵染,威胁到微生物区系的平衡时,有助于维持或建立宿主微生物生态平衡,间接控制对虾传染性疾病的发生和发展(Tannock, 1998; Chai *et al.*, 2016; Sha *et al.*, 2016)。研究证实,来自细菌细胞壁成分可作为甲壳动物免疫增强剂使用,因而,有益微生物的作用机理可能是通过菌种本身或细胞壁成分刺激动物非特异性免疫系统发挥作用,从而提高动物免疫力和抗病力(Rengpipat *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2006; Sruthy *et al.*, 2015)

含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶(Caspase)是古老进化史的多成员家族,具有进化上的保守性,并在细胞凋亡中起重要作用。Caspase 在细胞凋亡过程中,不仅是接受外界信号,使细胞发生凋亡,还是细胞凋亡的执行人,完成对特定蛋白底物的水解,而使细胞显示出系列凋亡特征(Wakiyama *et al.*, 2006)。Wu 等(2004)推测,当日本对虾(*Penaeus japonicus*)感染 WSSV 后,会启动一个高效的程序化细胞死亡机制来控制 WSSV 的入侵,且细胞凋亡的程度与感染程度密切相关。Phongdara 等(2006)克隆了斑节对虾(*Penaeus monodon*) Caspase 基因,证实该基因具有 Caspase-3 特征,且发现由病毒刺激或处于垂死状态的对虾中, Caspase 基因表达量升高。宋光年等(2010)克隆了中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)Caspase 基因,注射感染 WSSV 3 h 后,对虾肝胰腺中 Caspase 的表达呈现显著上调,推测该基因与细胞凋亡相关。本研究同样证实,益生菌日常饲喂凡纳滨对虾,不会对对虾肠道 Caspase 基因的表达产生影响,而当对虾感染 WSSV 后 6 h Caspase 基因表达量有所上升,18 h Caspase 基因表达量最高,而且经过复合芽孢杆菌饲料免疫的对虾较单一芽孢杆菌饲料的 Caspase 在同一时刻表达量差异显著。20~45 h 是对虾注射感染 WSSV 后病毒的指数生长期(宋晓玲等, 2002), Caspase 的高表达必然引发对虾鳃细胞的凋亡,从而减缓了病毒在对虾鳃细胞的增殖速度。但是, Caspase 基因的表达首先影响了 WSSV 的复制,而对虾累积死亡率到感染后的第 8 天呈现显著差异,原因尚待进一步研究。

硫氧还原蛋白(Trx)是广泛存在于原核细胞和真核细胞中的具有多种重要功能、在进化上保守的蛋白,1964 年在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中首先被发现。Trx 参与细胞的氧化还原调控,维持细胞蛋白处于还原状态,是一种重要的抗病抗逆蛋白(Jin *et al.*, 1997)。Garcia-Orozco 等(2012)比较了 WSSV 和

IHHNV 感染时凡纳滨对虾 *Trx* (LV*Trx*) 在 mRNA 和蛋白质水平上的异同, 结果证实病毒感染会提高对虾 *Trx* 基因的表达水平, 且 *Trx* 对 WSSV 比 IHHNV 有更明显的反应, WSSV 或 IHHNV 感染对虾还能诱导 LV*Trx* 蛋白的差异反应。本研究证实, 益生菌摄取和 WSSV 感染都能刺激 *Trx* 的表达, 相比较而言, 益生菌的刺激相对平缓; 而 WSSV 感染后, 各实验组对虾肠道 *Trx* 相对表达量在 18 h 时陡升到最大值, 且以复合芽孢杆菌组的激活能力最强。由此可见, 不仅不同的病毒感染对虾使其 *Trx* 表达水平不同, 不同功能微生物刺激对虾使其 *Trx* 表达水平也不相同, 这可能是由所研究对虾种类、组织类别和实验处理方式不同造成的。另外, 虽然实验组 *Trx* 自病毒感染后的 18~192 h 一直维持较高水平, 但实验组对虾累积死亡率到感染后的第 8 天(192 h)才呈现显著差异, 推测 *Trx* 基因表达的影响只是对虾抗病毒感染的一个环节, 对虾的抗病毒感染能力的提高是由多种原因和多个环节实现的。

综上所述, 自健康凡纳滨对虾肠道筛选的枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、短小芽孢杆菌通过添加到饲料中, 投喂给予凡纳滨对虾, 能够提高对虾的抗病毒感染能力, 且以这 3 株菌的复合形式投喂对虾的免疫保护率最高, 可作为抗白斑综合征的候选益生菌株。对虾抗病力的提高可能与芽孢杆菌减缓了病毒在靶组织的增殖速率, 提高了 *Caspase* 基因和 *Trx* 基因的表达水平相关。

参 考 文 献

- Chai PC, Song XL, Chen GF, *et al.* Dietary supplementation of probiotic *Bacillus* PC465 isolated from the gut of *Fenneropenaeus chinensis* improves the health status and resistance of *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome virus. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 54: 602–611
- Cheng XY, Liu QH, Huang J. Establishment of real-time fluorescent quantitative PCR assay for detecting white spot syndrome virus. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, 38(26): 14265–14267 [程晓艳, 刘庆慧, 黄健. 实时荧光定量 PCR 检测对虾白斑综合症病毒方法的建立. *安徽农业科学*, 2010, 38(26): 14265–14267]
- Du T, Li B, Wang YG, *et al.* Screening and characteristic analysis of potential probiotics from large water ponds used for sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) farming. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(3): 180–186 [杜佺, 李彬, 王印庚, 等. 刺参(*Apostichopus japonicus*)大水面养殖池塘环境中优势益生菌筛选及其特性分析. *渔业科学进展*, 2017, 38(3): 180–186]
- Flegel TW. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1997, 13(4): 433–442
- Garcia-Orozco KD, Sanchez-Paz A, Aispuro-Hernandez E, *et al.* Gene expression and protein levels of thioredoxin in the gills from the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with two different viruses: The WSSV or IHHNV. *Fish and Shellfish Immunology*, 2012, 32(6): 1141–1147
- Jin DY, Chae HZ, Rhee SG, *et al.* Regulatory role for a novel human thioredoxin peroxidase in NF- κ B activation. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(49): 30952–30961
- Lakshmi B, Viswanath B, Sai Gopal DV. Probiotics as antiviral agents in shrimp aquaculture. *Journal of Pathogens*, 2013, 424123
- Liu SL, Chen J, Li J, *et al.* Effects of complex-probiotic-preparation on the growth, digestive enzymes and the nonspecific immune indices of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(5): 100–106 [刘淑兰, 陈娟, 李杰, 等. 复合益生菌制剂对大西洋鲑 (*Salmo salar*) 生长、消化酶和非特异性免疫指标的影响. *渔业科学进展*, 2017, 38(5): 100–106]
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25: 402–408
- Ninawe AS, Selvin J. Probiotics in shrimp aquaculture: Avenues and challenges. *Critical Reviews in Microbiology*, 2009, 35(1): 43–66
- Phongdara A, Wanna W, Chotigeat W. Molecular cloning and expression of caspase from white shrimp *Penaeus merguensis*. *Aquaculture*, 2006, 252(2–4): 114–120
- Ravi AV, Musthafa KS, Jegathammbal G, *et al.* Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic *Vibrios* in marine aquaculture. *Letters in Applied Microbiology*, 2007, 45(2): 219–223
- Rengpipat S, Rukpratanporn S, Piyatiratitivorakul S, *et al.* Immunity enhancement on black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*, 2000, 191(4): 271–288
- Salinas I, Cueste A, Esteban MÁ, *et al.* Dietary administration of *Lactobacillus delbreeckii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses. *Fish and Shellfish Immunology*, 2005, 19(1): 67–77
- Sánchez-Ortiz AC, Angulo C, Luna-González A, *et al.* Effect of mixed-*Bacillus* spp isolated from pustulose ark *Anadara tuberculosa*, on growth, survival, viral prevalence and

- immune-related gene expression in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 59: 95–102
- Sha Y, Liu M, Wang B, *et al.* Bacterial population in intestines of *Litopenaeus vannamei* fed different probiotics or probiotic supernatant. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 26(10): 1736–1745
- Song GN, Jin SJ, Zhang JQ, *et al.* Cloning and expression of a caspase gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Marine Sciences*, 2010, 34(12): 1–7 [宋光年, 金松君, 张继泉, 等. 中国明对虾 caspase 基因的克隆与表达分析. *海洋科学*, 2010, 34(12): 1–7]
- Song XL, Huang J, Tang KFL, *et al.* The construction and analysis for cDNA clones of white spot syndrome virus of shrimp. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, 26(5): 444–451 [宋晓玲, 黄捷, Tang KFL, 等. 对虾白斑综合症病毒重组 cDNA 克隆的构建与分析. *水生生物学报*, 2002, 26(5): 444–451]
- Sruthy KS, Chaithanya ER, Sathyan N, *et al.* Molecular characterization and phylogenetic analysis of novel isoform of anti-lipopolysaccharide factor from the mantis shrimp, *Miyakea nepa*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2015, 7(4): 275–283
- Sun Y, Liu F, Song XL, *et al.* Effects of adding probiotics in the feed on non-specific immune gene expression and disease resistance of *Litopenaeus vannamei*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(4): 845–851 [孙艳, 刘飞, 宋晓玲, 等. 饲料中添加益生菌对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)非特异免疫基因表达量和抗病力的影响. *海洋与湖沼*, 2012, 43(4): 845–851]
- Tannock GW. Studies of the intestinal microflora: A prerequisite for the development of probiotics. *International Dairy Journal*, 1998, 8(5–6): 527–533
- Wakiyama M, Kaitsu Y, Yokoyama S. Cell-free translation system from *Drosophila* S2 cells that recapitulates RNAi. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 343(4): 1067–1071
- Wen CQ, Xue M, Liang HF, *et al.* Beneficial effects of *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* WF on larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*. *Beneficial Microbes*, 2015; 6(4): 525–533
- Wu J, Muroga K. Apoptosis does not play an important role in the resistance of ‘immune’ *Penaeus japonicus* against white spot syndrome virus. *Journal of Fish Diseases*, 2004, 27(1): 15–21
- Zhang SJ, Zhao XJ, Song XL, *et al.* Analysis of the culturable bacteria’s quantity and composition in the intestinal tract of cultivation shrimp. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2015, 24(2): 211–218 [张盛静, 赵小金, 宋晓玲, 等. 人工养殖对虾肠道内可培养细菌数量及组成分析. *上海海洋大学学报*, 2015, 24(2): 211–218]
- Zhang XJ, Song XL, Huang J. Impact of *Vibrio parahaemolyticus* and white spot syndrome virus (WSSV) co-infection on survival of penaeid shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2016, 34(6): 1278–1286
- Zhou J, Song XL, Huang J, *et al.* Effects of dietary supplementation of A3 α -peptidoglycan on innate immune responses and defense activity of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 2006, 251(1–4): 172–181
- Zokaeifar H, Babaei N, Saad CR, *et al.* Administration of *Bacillus subtilis* strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response, and resistance against *Vibrio harveyi* infection in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2014, 36(1): 68–74

(编辑 马瑾艳)

Effects of Single or Mixed *Bacillus* on WSSV Infection and Immune-Related Gene Expression in *Litopenaeus vannamei*

SUN Bochao^{1,2}, YANG Yunkai^{1,2}, LI Yuhong², SONG Xiaoling^{2①}, HUANG Jie²

(1. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Polit National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao); Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity, Qingdao 266071)

Abstract *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, and *B. pumilus*, were isolated from healthy *Litopenaeus vannamei*, and were added to the base feed surface in single and mixed treatments. Probiotic feed was fed to the shrimp daily, and the shrimp were infected by white spot syndrome virus (WSSV) three weeks later. During the virus infection, the cumulative mortality and the number of WSSV copies in the gill tissue were statistically analyzed for each group. The relative expression of cysteinyl aspartate specific proteinase gene (*Caspase*) and Thioredoxin gene (*Trx*) in the intestinal tissue of the shrimp was measured by real-time PCR during feeding of probiotic feed and virus infection. The results showed that the cumulative mortality of *B. subtilis* (Group A), *B. licheniformis* (Group B), *B. pumilus* (Group C) and *B. subtilis*+*B. licheniformis*+*B. pumilus* (Group D), were (73.3±7.0)%, (63.3±5.5)%, (75.0±7.9)% and (50.0±5.3)% respectively, significantly lower than that of the control group (Group PBS), where the cumulative mortality of shrimp was 100%. The number of WSSV copies in each experimental group firstly increased, and then declined in the whole infection stage, but the number of WSSV copies of *Bacillus* groups was significantly higher than that of the control group every time ($P<0.05$ or $P<0.01$). The number of WSSV copies in the gill tissue of the mixed *Bacillus* group was extremely significantly lower than that of the control group, in the 8 d after virus infection. The relative expression of the *Caspase* gene was not significant in the 21 d of feeding with probiotic feed. After WSSV infection, the relative expression of *Caspase* in the intestinal tissue of each group firstly increased and then decreased, with time, reaching the maximum at the 18th h. The relative expression of *Caspase* in the intestinal tissue of the mixed *Bacillus* group was the highest, with the expression level at the 96th h still significantly higher than that of the control group. Feeding with *Bacillus* spp. and infection of WSSV, both could stimulate expression of the *Trx* gene, and the stimulation of feeding with *Bacillus* spp. was relatively gentle. After WSSV infection, relative expression of the *Trx* gene in the intestinal tissue of each *Bacillus* group grew quickly to its maximum at the 18th h, which was extremely significantly higher than that of the control group, and the activation on *Trx* gene expression from the mixed *Bacillus* group was the strongest. It can be surmised that the enhancement of the anti WSSV infection ability of shrimp may be related to the reduction of the speed of virus amplification in the target tissue, and the increase of the expression level of the anti-infection genes, such as *Caspase* and *Trx*, that were brought by feeding *Bacillus* spp.

Key words *Litopenaeus vannamei*; *Bacillus* spp.; WSSV; *Caspase*; *Trx*; Real-time PCR

① Corresponding author: SONG Xiaoling, E-mail: songxl@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180421002

http://www.yykxjz.cn/

宋增磊, 董宣, 赵若恒, 王秀华, 武和英, 于党辉, 谢国驹, 黄捷. 基于TaqMan qPCR检测凡纳滨对虾样品中虾肝肠胞虫并样检测方法的评价. 渔业科学进展, 2019, 40(3): 122-132

Song ZL, Dong X, Zhao RH, Wang XH, Wu HY, Yu DH, Xie GS, Huang J. Evaluation on the detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* in pooled DNA samples of *Litopenaeus vannamei* based on TaqMan qPCR. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(3): 122-132

基于 TaqMan qPCR 检测凡纳滨对虾样品中 虾肝肠胞虫并样检测方法的评价*

宋增磊^{1,2} 董宣² 赵若恒³ 王秀华² 武和英^{1,2}
于党辉^{1,2} 谢国驹² 黄捷^{1,2①}



(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 青岛 266071; 3. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116023)

摘要 对山东海阳和潍坊的2个养殖凡纳滨对虾群体取样, 采用 TaqMan qPCR 逐尾检测肝胰腺中的虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)载量, 再将提取的 DNA 样品按 5 并 1(5 : 1)、25 并 1(25 : 1)、50 并 1(50 : 1)、100 并 1(100 : 1)和 150 并 1(150 : 1)进行并样, 检测并样的 EHP 载量。设定不同临界循环数为假定灵敏度, 定性判断各单尾检测阳性及并样组阳性, 比较不同并样模式与检测阳性率、诊断灵敏度、诊断特异性等之间的关系以及定量的准确性。结果表明, 检测灵敏度过低, 会降低高并样率检测的准确性; 阳性率在 30%以上时, 高并样率的检测结果与单样品检测相符性很好; 高载量感染的阳性率不低于 6.7%时, 50 : 1 以内的并样能准确得出检测结果; 低载量感染的阳性率不低于 16%时, 25 : 1 以内的并样能得出较好结果; 高载量感染的 1.3%阳性率和低载量感染的 8%阳性率可能导致所有并样出现假阴性结果; 各种并样模式均有很好的诊断特异性, 50 : 1 并样的诊断灵敏度与 OIE 标准推荐的 5 : 1 并样的接近; 各并样检测的 EHP 载量与单样品检测平均值之比在 0.27~2.83 范围, 二者存在极显著相关性, 各种并样模式的定量检测结果在数量级水平能大致反映样品的平均 EHP 载量。本研究为水生动物疫病诊断和流行病学调查的样品检测提供了参考依据。

关键词 凡纳滨对虾; 虾肝肠胞虫(EHP); qPCR; 并样检测

中图分类号 S945.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)03-0122-11

水产养殖是一种典型的大群体操作, 其疾病诊断 和流行病学研究是基于少量样品的测试而完成的。样

* 现代农业产业技术体系(CARS-48)、中国东盟海上合作基金项目(2016~2018)和中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2017HY-ZD10)共同资助 [This work was supported by China Agriculture Research System (CARS-48), China ASEAN Maritime Cooperation Fund Project (2016~2018), and Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Chinese Academy of Fishery Sciences (2017HY-ZD10)]. 宋增磊, E-mail: 479943494@qq.com

① 通讯作者: 黄捷, 研究员, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-04-21, 收修改稿日期: 2018-05-04

品的代表性是得出正确的疾病诊断结果和可靠的流行病学研究结论的关键,但这一关键在生产中常常被忽视。对一个群体进行随机采样时,达到95%可信度的采样率所需被全部检测到的样品数量与群体中疫病的不同流行率及群体大小相关,以含有10万个以上个体的大群体为例,在2%的疾病流行率时的被检测的样本数要求达到150;10%流行率时要求达到30个样本(Ossiander *et al*, 1973),这样的采样率在实际生产的诊断应用中如果都进行单尾检测会造成极高的成本,使养殖业者难以承受,而并样检测则能够降低成本,但也很容易造成假阴性的现象。因此,需对并样检测方法进行评估,来保证诊断结果的可靠性和可行性(Williams *et al*, 2001)。在OIE标准及美国标准中,都有最多每5个个体进行并样的建议,但这样的并样方法在水生动物疾病研究中并没有明确的研究数据支持(OIE, 2017; FHS, 2014)。在陆生动物疾病研究中,也只有少量研究报道(Muñoz-Zanzi *et al*, 2000; Arnold *et al*, 2009; Rovira, 2008)。因此,有必要对水生动物疾病样品检测中的并样问题开展研究。

自2003年以来,泰国养殖斑节对虾(*Penaeus monodon*)出现生长缓慢综合征(MSGS),造成了严重的经济损失(Chayaburakul *et al*, 2004)。在2009年,泰国研究者在生长缓慢的斑节对虾肝胰腺中检测到虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)(Tourtip *et al*, 2009),EHP感染并没有明显的临床病变特征,对于该病原的诊断主要通过组织学观察、PCR法、地高辛标记核酸探针原位杂交法以及LAMP检测方法(Tangprasittipap *et al*, 2013; Suebsing *et al*, 2013)。2013年,中国水产科学研究院黄海水产研究所养殖生物疾病控制与分子病理学研究室建立了EHP的SYBR Green qPCR方法,并首次在中国养殖的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)中检出EHP。进一步对养殖对虾群体的单尾EHP载量和体长关系分析表明,对虾肝胰腺样品总DNA(HpDNA)中EHP载量在 10^3 copies/(ng HpDNA)以上时,代表了较高的风险水平(刘珍等, 2016)。Liu等(2018)建立了EHP的TaqMan探针qPCR方法,灵敏度高于SYBR Green qPCR和套式PCR方法,并证实上述EHP载量与对虾生长关系的存在,这些研究为EHP的检测和防控提供了多项技术手段。

EHP的定量检测对于养殖风险的判定具有重要意义,但针对大抽样量存在过高的检测工作量和成本问题,为了提高EHP检测的适用性和有效性,有必要考虑应用并样检测方案。本研究以TaqMan qPCR的EHP检测方法为基础,考察不同并样方案对EHP

检测的影响,以期水生动物病原检测技术的实际应用和水生动物流行病学监测提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源

2017年6月~7月自山东海阳和潍坊2家养殖场分批采集凡纳滨对虾,海阳样品编号为60401~60450,潍坊样品编号为60301~60350、61401~61450和70701~70750。每尾活虾用3倍以上体积的95%乙醇进行保存。

1.2 肝胰腺总DNA提取

95%乙醇中保存的对虾肝胰腺组织经无菌海水冲洗去除乙醇后,用一次性解剖刀片切取约30 mg,利用海洋动物组织基因组DNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司)提取处理好的样品肝胰腺总DNA,用核酸分析仪(NanoDrop 2000c, Thermo)测定样品的DNA浓度,并分析提取的DNA质量,然后根据DNA浓度的不同,对其进行适当地稀释后,将DNA样品置于-20℃冰箱保存。

1.3 样品EHP载量的检测

将1.2中保存的DNA样品用Liu等(2018)建立的TaqMan探针法实时荧光qPCR进行检测,根据本研究并样检测时的阴性对照扩增曲线确定阴性循环阈值(C_{tN})为31,对各样品EHP载量进行计算。

1.4 样品的并样检测方案

1.4.1 海阳样品的并样检测 将山东海阳的50份样品按照样品编号顺序,每5个为1组,对每个样品取10 μl DNA至1.5 ml离心管中,充分混匀后,确定其浓度仍在200 ng/μl,得到10个5:1(5P)并样方式的样品,分别命名为H5P01~H5P10,再对这10个样品采取同样的方法进行并样,得到2个25:1(25P)并样方式的样品,分别命名为H25P01和H25P02。对这12个新并样的样品进行EHP检测,与组内对应样品检测结果取平均值进行比较。

1.4.2 潍坊样品的并样检测 将山东潍坊的3次跟踪采样的样品分别按照山东海阳样品的并样方法进行处理,每批样品得到5:1(5P)并样后的10个样品,分别命名为W5P01~W5P30,再对30个样品采取同样的方法进行并样,得到6个25:1(25P)并样方式的样品,分别命名为W25P01~W25P06,接着对这6个样品每2个进行并样,得到3个50:1(50P)并样样品,分别命名为W50P01~W50P03,对50P的

3 个样品两两并样,得到 3 个 100 : 1 (100P)并样品,分别命名为 W100P01~W100P03,最后对 50P 的 3 个样品进行并样,得到 1 个 150 : 1 (150P)并样品 W150P01。对并样后的各样品进行 EHP 载量检测,与单个样品检测的结果进行比较。

1.5 并样检测的定性分析

为了考察在不同阳性强度的水平下并样对阳性检出的影响,通过划定不同的假定临界循环值(C_a),分别用海阳和潍坊样品的 EHP 检测的循环阈值(C_t)与 C_a 值比较,样品扩增曲线在 C_a 值之前升起,即 $C_t \leq C_a$,则判定为分析阳性,否则为分析阴性,求出不同 C_a 值的各并样组阳性和阴性数目。根据并样组的单个样品分析阳性判定并样组已知阳性,即并样组中有 1 个及 1 个以上单一样品为阳性,则并样组为已知阳性。以上述阴性和阳性数据为基础,计算不同假定临界循环值下的已知阳性数/检测到的阳性数、不同并样模式的已知阳性率和测试阳性率、不同已知阳性率的各并样组的已知阳性数/检测到的阳性数、低阳性率并样组的已知阳性数和检测阳性数、不同并样模式的诊断灵敏度和诊断特异性(OIE, 2017)。

1.6 并样检测的定量分析

在 Microsoft Excel 2016 中,根据单一样品的 EHP 载量,按各并样组进行平均,计算并样组 EHP 的已知载量。与各并样组实际检测的载量进行比较,包括计算检测值与已知载量值的差值和变异系数,分析已知载量与实际检测之间的相关系数(R),根据函数式 $P=TDIST(t, df, 2)$ (其中, $t=|R/\sqrt{(1-R^2)/df}|$, $df=n-2$, n 为样本数)计算双尾概率(P),以 $P<0.05$ 作为显著水平, $P<0.01$ 作为极显著水平。

2 结果

2.1 样品 EHP 载量的检测结果

对山东海阳 50 个样品和山东潍坊 3 次采样的 150 个样品逐尾进行 EHP 的载量检测(表 1)。其中,海阳群体样品有 18 个阳性, 32 个阴性,阳性率为 36%;潍坊第 1、2 次采样群体中样品全部为阴性;第 3 次采样群体中样品全部为阳性,阳性率为 100%。

2.2 并样检测结果的定性分析

2.2.1 不同假定灵敏度下并样检测的阳性率 分别对海阳和潍坊样品进行不同模式的并样检测,比较在不同 C_a 值下,并样组已知阳性数和检测阳性数(表 2)。结果显示,在低假定灵敏度下,带阳性的并

样实际检测容易出现阴性,5 : 1 并样时,在多种灵敏度下都存在检出的阳性数量下降的情况,而高灵敏度下实际检测的阳性数量符合已知阳性数量,而 50 : 1 以上并样的检测差异主要出现在极低灵敏度的情况。

2.2.2 不同并样模式的阳性检出 比较 2 个采样群体不同并样模式的分组在 16~31 个临界循环的假定灵敏度下总的已知阳性率和并样检测阳性率(表 3),结果显示,较高并样率下的阳性率总是大于或等于较低并样率下的阳性率。从潍坊群体的 50 : 1~150 : 1 并样的已知阳性率变化可以看到,对单一样品(并样率 1 : 1)并样或从较低并样率的样本再并样时,并样已知阳性率变化范围符合关系:较低并样率的阳性率 \leq 较高并样率的阳性率 \leq 较低并样率的阳性率 \times 较高并样率/较低并样率。当并样前各组阳性率相同时,并样后就有同样的阳性率,当并样前有各并样模式中根据单样品检测结果推定的已知阳性率略高于对并样进行实际检测所得出的阳性率。

2.2.3 不同阳性率并样的阳性检出 按不同并样组中个体的阳性率区间,统计所有 16~31 个临界循环的假定灵敏度下各并样组按单样品推定的已知阴性或阳性的数量,与并样组经实验检测所得的相应数量进行比较(表 4)。结果显示,当阳性率在 0.1%~10.0% 时,25 : 1~150 : 1 的并样组均未测出阳性,阳性率为 10.1%~20.0% 时,上述并样组的实验测试所得的阳性数量与已知阳性数量也有出入,20.0% 阳性时,5 : 1 并样组也只测出已知阳性的 1/2 数量的阳性;阳性率在 40.0% 的 5 : 1 并样组的测试阳性与已知阳性也有少量差异,但 30.1%~40.0% 阳性率的 25 : 1~150 : 1 并样组所有样品均检出了与已知阳性数量相同的结果;更高阳性率的各并样组的实验测试阳性数量与已知阳性数量均没有差异。

对并样组内阳性率(即并样组中的单样品的阳性率)低而未能有效检出的情况进行具体分析(表 5),结果显示,在海阳样品中,最终并样组(25 : 1)中有 2 尾以下对虾为阳性(阳性率 8.0%)时,其相关的 5 : 1 和 25 : 1 有已知阳性的并样组均未能检出阳性;最终并样组有 3 尾对虾为阳性(阳性率 12.0%)时,其相关的 5 : 1 已知阳性的并样组有部分阳性检出,但 25 : 1 并样组未能检出;最终并样组中有 4 尾对虾为阳性(阳性率为 16.0%)时,相关的 5 : 1 并样组有部分阳性检出,但 25 : 1 的并样组未能检出。在潍坊样品中,最终并样组(150 : 1)有 2 尾对虾为阳性(阳性率 1.3%)时,其相关的所有 5 : 1~150 : 1 并样组均未能检出阳性;有 6 尾对虾为阳性(阳性率 4.0%)时,已知阳性 5 : 1 并样组部分能检出阳性,但 25 : 1~150 : 1 的并样组

表 1 凡纳滨对虾样品中肝胰腺的 EHP 拷贝数
Tab.1 EHP copies in hepatopancreas of farmed *L. vannamei*

样品编号 Sample No.	虾肝肠胞虫 EHP	样品编号 Sample No.	虾肝肠胞虫 EHP	样品编号 Sample No.	虾肝肠胞虫 EHP	样品编号 Sample No.	虾肝肠胞虫 EHP
60301	0	60401	0	61401	0	70701	$(4.74 \pm 1.30) \times 10^4$
60302	0	60402	0	61402	0	70702	$(9.68 \pm 0.29) \times 10^3$
60303	0	60403	0	61403	0	70703	$(6.39 \pm 0.59) \times 10^3$
60304	0	60404	$(1.79 \pm 0.25) \times 10^3$	61404	0	70704	$(5.49 \pm 0.47) \times 10^2$
60305	0	60405	$(1.45 \pm 0.17) \times 10^3$	61405	0	70705	$(9.99 \pm 1.76) \times 10^3$
60306	0	60406	$(4.92 \pm 0.10) \times 10^2$	61406	0	70706	$(5.15 \pm 0.68) \times 10^3$
60307	0	60407	0	61407	0	70707	$(2.17 \pm 0.02) \times 10^4$
60308	0	60408	$(9.63 \pm 0.49) \times 10^1$	61408	0	70708	$(2.02 \pm 0.33) \times 10^3$
60309	0	60409	0	61409	0	70709	$(9.72 \pm 0.11) \times 10^2$
60310	0	60410	0	61410	0	70710	$(9.72 \pm 0.11) \times 10^2$
60311	0	60411	0	61411	0	70711	$(1.04 \pm 0.17) \times 10^4$
60312	0	60412	0	61412	0	70712	$(1.62 \pm 0.02) \times 10^4$
60313	0	60413	0	61413	0	70713	$(2.05 \pm 0.03) \times 10^4$
60314	0	60414	0	61414	0	70714	$(5.11 \pm 0.60) \times 10^4$
60315	0	60415	$(2.36 \pm 0.17) \times 10^2$	61415	0	70715	$(1.70 \pm 0.17) \times 10^3$
60316	0	60416	0	61416	0	70716	$(6.64 \pm 0.90) \times 10^3$
60317	0	60417	$(2.36 \pm 0.66) \times 10^2$	61417	0	70717	$(3.98 \pm 0.11) \times 10^4$
60318	0	60418	0	61418	0	70718	$(3.46 \pm 0.56) \times 10^4$
60319	0	60419	0	61419	0	70719	$(3.53 \pm 0.08) \times 10^3$
60320	0	60420	0	61420	0	70720	$(1.98 \pm 0.50) \times 10^3$
60321	0	60421	0	61421	0	70721	$(1.58 \pm 0.02) \times 10^3$
60322	0	60422	$(1.83 \pm 0.15) \times 10^3$	61422	0	70722	$(5.27 \pm 0.07) \times 10^3$
60323	0	60423	$(2.02 \pm 0.16) \times 10^2$	61423	0	70723	$(3.78 \pm 0.27) \times 10^3$
60324	0	60424	0	61424	0	70724	$(1.27 \pm 0.03) \times 10^4$
60325	0	60425	$(1.22 \pm 0.11) \times 10^2$	61425	0	70725	$(7.42 \pm 1.51) \times 10^2$
60326	0	60426	$(1.20 \pm 0.16) \times 10^2$	61426	0	70726	$(7.82 \pm 1.68) \times 10^3$
60327	0	60427	0	61427	0	70727	$(1.18 \pm 0.06) \times 10^2$
60328	0	60428	$(1.06 \pm 0.08) \times 10^2$	61428	0	70728	$(1.06 \pm 0.19) \times 10^3$
60329	0	60429	0	61429	0	70729	$(3.07 \pm 0.17) \times 10^3$
60330	0	60430	0	61430	0	70730	$(2.32 \pm 0.45) \times 10^2$
60331	0	60431	0	61431	0	70731	$(2.44 \pm 0.22) \times 10^3$
60332	0	60432	0	61432	0	70732	$(9.52 \pm 0.76) \times 10^3$
60333	0	60433	0	61433	0	70733	$(1.63 \pm 0.77) \times 10^4$
60334	0	60434	$(2.48 \pm 0.23) \times 10^2$	61434	0	70734	$(9.24 \pm 1.08) \times 10^4$
60335	0	60435	$(3.88 \pm 0.45) \times 10^1$	61435	0	70735	$(1.91 \pm 0.06) \times 10^4$
60336	0	60436	0	61436	0	70736	$(3.76 \pm 0.17) \times 10^3$
60337	0	60437	$(7.47 \pm 1.03) \times 10^1$	61437	0	70737	$(3.88 \pm 0.01) \times 10^3$
60338	0	60438	0	61438	0	70738	$(1.77 \pm 0.14) \times 10^2$
60339	0	60439	$(2.31 \pm 0.10) \times 10^2$	61439	0	70739	$(6.52 \pm 0.70) \times 10^2$
60340	0	60440	0	61440	0	70740	$(3.10 \pm 0.24) \times 10^4$
60341	0	60441	0	61441	0	70741	$(6.26 \pm 0.14) \times 10^3$
60342	0	60442	0	61442	0	70742	$(5.77 \pm 0.09) \times 10^2$
60343	0	60443	$(7.81 \pm 0.81) \times 10^2$	61443	0	70743	$(8.71 \pm 0.38) \times 10^2$
60344	0	60444	0	61444	0	70744	$(1.01 \pm 0.09) \times 10^4$
60345	0	60445	0	61445	0	70745	$(2.84 \pm 0.66) \times 10^3$
60346	0	60446	0	61446	0	70746	$(1.03 \pm 0.07) \times 10^3$
60347	0	60447	$(1.34 \pm 0.07) \times 10^2$	61447	0	70747	$(1.24 \pm 0.79) \times 10^5$
60348	0	60448	$(5.45 \pm 1.21) \times 10^2$	61448	0	70748	$(5.41 \pm 0.29) \times 10^4$
60349	0	60449	0	61449	0	70749	$(1.63 \pm 0.08) \times 10^3$
60350	0	60450	0	61450	0	70750	$(4.74 \pm 0.10) \times 10^3$

注: EHP 为每 ng 肝胰腺总 DNA 的 EHP SSU rRNA 基因的拷贝数(copies/ng HpDNA)。0 代表大于 31 个 qPCR 扩增循环的阴性检测结果

Note: EHP means copies of SSU rRNA gene of EHP per ng total hepatopancreatic DNA (copies/ng HpDNA). 0 means negative result above 31 cycles during qPCR amplification

表 2 不同假定灵敏度下并样组阳性情况
Tab.2 The positive number of sample detection at different assumed sensitivities

假定临界 循环值 Assumed threshold cycles	不同并样的已知阳性数/检测阳性数 Ratio of known positive numbers to detected positive numbers by different pooling				
	5 : 1 (n=40)	25 : 1 (n=8)	50 : 1 (n=3)	100 : 1 (n=3)	150 : 1 (n=1)
16	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
17	2/0	1/0	1/0	2/0	1/0
18	5/2	2/0	1/0	2/0	1/0
19	6/4	2/1	1/1	2/0	1/0
20	9/5	2/2	1/1	2/0	1/0
21	10/8	2/2	1/1	2/2	1/1
22	10/9	2/2	1/1	2/2	1/1
23	12/9	3/2	1/1	2/2	1/1
24	12/11	3/2	1/1	2/2	1/1
25	14/11	4/3	1/1	2/2	1/1
26	17/11	4/3	1/1	2/2	1/1
27	19/13	4/3	1/1	2/2	1/1
28	20/17	4/4	1/1	2/2	1/1
29	20/19	4/4	1/1	2/2	1/1
30	20/20	4/4	1/1	2/2	1/1
31	20/20	4/5	1/1	2/2	1/1
合计 Sum	196/159	45/37	15/13	30/22	15/11

注: 已知阳性是根据单样品检测结果推定的并样组结果, 并样组中有一个单样品在假定临界循环值(C_a)下判定为阳性, 则该并样组为已知阳性; C_a 指假定的判定阳性和阴性的临界循环数, 样品检测到扩增的循环数大于 C_a 值, 判定该样品为阴性

Note: Known positive was resulted from the detected individuals in the pooled sample group. If an individual in the pooled samples was positive under the assumed threshold cycles (C_a), the pooled sample group was decided as a known positive. C_a is the critical cycles to determine positive and negative. If non amplification was detected above C_a , the sample was determined as negative

均未能检出阳性; 有 10 和 17 尾对虾为阳性(阳性率分别为 6.7%和 11.3%)时, 已知阳性的 5 : 1、25 : 1 和 50 : 1 并样组能有阳性检出, 但 100 : 1 和 150 : 1 的并样均为能检出。

2.2.4 并样检测的诊断灵敏度和诊断特异性 统计所有 16~31 个临界循环的假定灵敏度下不同并样模式的已知阳性和已知阴性对应于检测阳性和检测阴性的数量, 其中, 已知阳性并样检出为阳性则为真阳性, 已知阴性检出为阳性则为假阳性, 已知阴性检出为阴性则为真阴性, 已知阳性检出为阴性则为假阴性, 计算得出各并样模式下的诊断灵敏度和诊断特异性(表 6), 结果显示, 5 : 1~50 : 1 的诊断灵敏度均不低

于 80%, 且 5 : 1 和 50 : 1 的诊断灵敏度接近, 100 : 1~150 : 1 的诊断灵敏度有所下降。5 : 1~25 : 1 的诊断特异性为 99.5%~98.8%, 50 : 1~150 : 1 的诊断特异性均达 100%。

2.3 并样检测的定量分析

2.3.1 并样检测值与平均值的比较 对海阳和潍坊群体单样品 EHP 载量平均值和并样检测的 EHP 载量进行比较(表 7)。结果显示, 海阳样品的 10 个 5 : 1 并样检测值有 4 个高于单样品平均值, 6 个低于单样品平均值, 其中, 3 个并样的差值在平均值的 50%以上; 2 个 25 : 1 并样的检测值分别不高于和低于平均值的 50%。潍坊样品的 5 : 1 并样中, 20 个阴性并样中 1 个检出了弱阳性, 其余阴性并样在 31 个循环内仍为阴性; 9 个阳性并样的检测值均高于平均值, 其差异幅度为平均值的 10%~183%。潍坊样品 25 : 1 并样中, 4 个阴性并样有 1 个在 31 个循环内检出了弱阳性; 2 个阳性并样的检测值均低于平均值, 差异幅度在平均值的 5%~50%范围。50 : 1~150 : 1 的并样中, 除了阴性并样的检测值依然为阴性, 其余阳性并样的检测值均低于平均值, 差异幅度在 14%~61%范围。总体来说, 在 31 个循环的检测灵敏度区间, 海阳和潍坊的 5 : 1~150 : 1 并样的定量检测结果与单个样品的平均值的比值在(0.27±0.28)~(2.83±0.08)范围内, 平均为(1.26±0.78), 说明各种并样模式所得的定量检测结果在数量级水平能大致反映样品的平均 EHP 载量。

2.3.2 并样的 EHP 载量的定量检测值与并样组已知量的相关性 分析并样的 EHP 载量的定量检测值的对数(LgD)与并样组根据单一样品计算得到的已知量的对数(LgK)的关系(图 1), 结果显示, 二者呈线性关系($R=0.9741$), 相关性极显著($P=2.64 \times 10^{-19}$), $LgD=(1.055 \pm 0.028)LgK - (0.153 \pm 0.095)$ 。

3 讨论

2017 年国家虾蟹产业技术体系开展的被动监测结果显示, 虾肝肠胞虫(EHP)已在中国虾类主要养殖区广泛分布, 在山东、河北、江苏、上海、浙江、福建、广东、海南和新疆均有不同程度地检出。EHP 感染引起的肝胰腺微孢子虫病(HPM)是近年来养殖对虾经常发生生长缓慢的主要原因, 对虾肝胰腺中 EHP 的载量在 10^3 copies/ng HpDNA 以上时, 代表了较高的风险(刘珍等, 2016), 而且体长相同时, EHP 阳性群体的平均体重比阴性群体低 30%, 个体大小和体重差异显著增加(刘雅梅等, 2017)。由于 EHP 感染

表 3 不同并样模式的阳性率
Tab.3 The positive rates under different pooling modes

并样方式 Pooling mode	并样已知阳性率 Known positive rate		并样测试阳性率 Detected positive rate	
	海洋样品	潍坊样品	海洋样品	潍坊样品
	Haiyang samples	Weifang samples	Haiyang samples	Weifang samples
1 : 1	12.9% (103/800)	21.5% (517/2400)	–	–
5 : 1	40.0% (64/160)	27.5% (132/480)	30.0% (48/160)	23.1% (111/480)
25 : 1	50.0% (16/32)	30.2% (29/96)	34.4% (11/32)	27.1% (26/96)
50 : 1	56.3% (9/16)	31.3% (15/48)	ND	27.1% (13/48)
100 : 1	–	62.5% (30/48)	–	45.8% (22/48)
150 : 1	–	93.8% (15/16)	–	68.8% (11/16)

注: 并样已知阳性率为并样已知阳性组数/并样总样品组数, 样品的分组按并样组合进行, 组内有 1 个以上样品检出阳性, 则该组为并样已知阳性; 并样测试阳性率为实验测试的阳性并样数/总并样数。ND: 未测试; –: 不存在或无法计算, 下同

Note: Known positive rate is the ratio of known number of positive groups of pooled samples to the number of all sample groups of pooled samples. Pooled samples was grouped according to the combination of samples to be pooled. Known positive groups are the number of groups with at least one positive sample in the group. Detected positive rate of pooled samples is detected number of pooled positives to the number of pooled samples. ND: Not detected; –: Not exist or unable to calculate, the same as below

表 4 不同阳性率的并样的已知/检测的阴性和阳性数比较
Tab.4 Comparison of known and detected negative or positive numbers of pooled samples with different positive rate of single sample in pooled group

并样组内阳性率 Inner positive rate of pooling group	不同并样的已知数/检测数 Ratio of known number to detected number by different pooling				
	5 : 1	25 : 1	50 : 1	100 : 1	150 : 1
Negative (0%)	444/469	83/92	33/35	18/26	1/5
0.1%~10.0%	–	3/0	1/0	6/0	3/0
10.1%~20.0%	45/23	8/2	2/1	2/0	2/1
20.1%~30.0%	–	1/1	0/0	2/2	3/3
30.1%~40.0%	45/42	12/12	1/1	4/4	7/7
40.1%~50.0%	–	0/0	1/1	16/16	0/0
50.1%~60.0%	14/14	2/2	0/0	0/0	0/0
60.1%~70.0%	–	2/2	1/1	0/0	0/0
70.1%~80.0%	17/17	1/1	1/1	0/0	0/0
80.1%~90.0%	–	2/2	1/1	0/0	0/0
90.1%~100.0%	75/75	14/14	7/7	0/0	0/0

注: 并样组内阳性率为并样组中的单样品的阳性率, 0%阳性率的数据为并样组已知/检测的阴性组数, 0.1%~100.0%的数据均为并样组已知/检测的阳性组数

Note: The inner positive rate of pooling group means the positive rate of individuals in a pooling group. The numbers in the row of 0.0% are known numbers/detected numbers of negative groups of the pooling groups. The numbers in rows of 0.1%~100.0% are known numbers/detected numbers of positive groups of the pooling groups

还没有有效的防治药物, 苗种产地检疫工作中进行该病原的定性或定量检测, 对于该病的预防具有重要意义。本研究对采集的 2 个群体的样品进行逐尾检测, 海阳群体采样的阳性率为 36%; 而潍坊群体前 2 次采样共计 100 尾稚虾, 经 31 个循环的扩增均未检出阳性, 表明早期采样可能遇到阳性率很低的情况, 需要进行大样本量的采样和检测。PCR 检测的成本可达 40~200 元/反应, 在认证实验室开展检测的成本可能

更高, 养殖场对大样本量的逐尾检测从成本来说显然是无法承受的, 因此, 并样检测通常是产业唯一能接受的检测方式。

在大量样本中检出很少的阳性对于检测方案是个挑战。在阳性率低的情况下, 并样检测随着混合样本数的增加, 样本中阳性靶标会被稀释, 这就需要检测方法具有很高的灵敏性和特异性(顾卫东, 1998; Arnold *et al*, 2009)。中国水产科学研究院黄海水产研

表5 低阳性率的并样检测分析
Tab.5 Detection of pooled samples with low positive rate

阳性数/总数 Positives/Total	阳性率 Positive rate	5 : 1		25 : 1		50 : 1		100 : 1		150 : 1	
		K/T	D/T	K/T	D/T	K/T	D/T	K/T	D/T	K/T	D/T
1/25	4.0%	1/5	0/5	1/1	0/1	-	-	-	-	-	-
2/25	8.0%	2/5	0/5	1/1	0/1	-	-	-	-	-	-
3/25	12.0%	4/10	2/10	2/2	0/2	-	-	-	-	-	-
4/25	16.0%	4/5	1/5	1/1	0/1	-	-	-	-	-	-
2/150	1.3%	2/30	0/30	1/6	0/6	1/3	0/3	2/3	0/3	1/1	0/1
6/150	4.0%	5/30	3/30	2/6	0/6	1/3	0/3	2/3	0/3	1/1	0/1
10/150	6.7%	6/30	5/30	2/6	1/6	1/3	1/3	2/3	0/3	1/1	0/1
17/150	11.3%	9/30	6/30	2/6	2/6	1/3	1/3	2/3	0/3	1/1	0/1

注：阳性数/总数为最终并样组的阳性个体数量和总个体数量之比，前4行为海阳样品，后4行为潍坊样品；K/T：已知阳性并样数/总并样数；D/T：检测到的阳性并样数/总并样数

Note: Positives/Total is the ratio of the number of positive individuals to the number of total individuals in the final pooling group. The above 4 rows are data of Haiyang samples, and the below 4 rows are data of Weifang samples. K/T: Ratio of known positive pooled sample / total pooled sample. D/T: Ratio of detected positive pooled sample / total pooled sample

表6 不同并样模式的诊断灵敏度和诊断特异性
Tab.6 Diagnostic sensitivity and diagnostic specificity of different pooling modes

并样模式 Pooling mode	真阳性 TP	真阴性 TN	假阳性 FP	假阴性 FN	诊断灵敏度 DSe(%)	诊断特异性 DSp(%)
5 : 1	171	442	2	25	87.2	99.5
25 : 1	36	82	1	9	80.0	98.8
50 : 1	13	33	0	2	86.7	100.0
100 : 1	22	18	0	8	73.3	100.0
150 : 1	11	1	0	4	73.3	100.0

注：诊断灵敏度=真阳性/(真阳性+假阴性)；诊断特异性=真阴性/(真阴性+假阳性)

Note: DSe = TP/(TP+FN); DSp = TN/(TN+FP); TP: True positive; TN: True negative; FP: False positive; FN: False negative; DSe: Diagnostic sensitivity; DSp: Diagnostic specificity

表7 海阳样品2种检测结果的比较
Tab.7 The comparison of two kinds of test results of samples from Haiyang

编号 Code	样品平均值 Mean of pooled samples (copies/ng)	并样检测值 Detected value of pooled samples (copies/ng)	差值 Difference (copies/ng)	变异系数 Variable coefficient (%)
H5P01	$(6.48 \pm 0.80) \times 10^2$	$(1.22 \pm 0.99) \times 10^3$	$(5.71 \pm 10.7) \times 10^2$	88.3±179.1
H5P02	$(1.18 \pm 0.03) \times 10^2$	$(9.70 \pm 1.70) \times 10^1$	$-(2.07 \pm 2.0) \times 10^1$	-(17.8±31.2)
H5P03	$(4.73 \pm 0.34) \times 10^1$	$(6.06 \pm 0.77) \times 10^1$	$(1.33 \pm 1.11) \times 10^1$	28.1±49.0
H5P04	$(4.72 \pm 1.32) \times 10^1$	$(7.17 \pm 0.41) \times 10^1$	$(2.43 \pm 1.73) \times 10^1$	51.9±90.5
H5P05	$(4.31 \pm 0.34) \times 10^2$	$(6.11 \pm 0.89) \times 10^2$	$(1.80 \pm 1.23) \times 10^2$	41.8±47.4
H5P06	$(4.51 \pm 0.46) \times 10^1$	$(4.14 \pm 0.54) \times 10^1$	$-(3.76 \pm 10.0) \times 10^0$	-(8.2±146.5)
H5P07	$(5.73 \pm 0.54) \times 10^1$	$(5.25 \pm 0.35) \times 10^1$	$-(4.87 \pm 8.90) \times 10^0$	-(8.4±128)
H5P08	$(6.10 \pm 0.41) \times 10^1$	$(4.46 \pm 0.91) \times 10^1$	$-(1.64 \pm 1.32) \times 10^1$	-(26.9±46.6)
H5P09	$(1.56 \pm 0.16) \times 10^2$	$(9.96 \pm 0.78) \times 10^1$	$-(5.65 \pm 2.38) \times 10^1$	-(36.2±43.6)
H5P10	$(1.36 \pm 0.25) \times 10^2$	$(6.77 \pm 1.50) \times 10^1$	$-(6.80 \pm 4.00) \times 10^1$	-(50.2±66.0)
H25P01	$(2.58 \pm 0.27) \times 10^2$	$(3.42 \pm 0.23) \times 10^2$	$(8.35 \pm 5.00) \times 10^1$	32.6±51.5
H25P02	$(9.11 \pm 1.08) \times 10^1$	$(5.32 \pm 0.80) \times 10^1$	$-(3.79 \pm 1.88) \times 10^1$	-(41.6±49.1)
W5P01~W5P16	0	0	0	-
W5P17	0	$(2.35 \pm 1.21) \times 10^1$	$(2.35 \pm 1.21) \times 10^1$	-

续表 7

编号 Code	样品平均值 Mean of pooled samples (copies/ng)	并样检测值 Detected value of pooled samples (copies/ng)	差值 Difference (copies/ng)	变异系数 Variable coefficient
W5P18~W5P20	0	0	0	-
W5P21	$(1.48 \pm 0.31) \times 10^4$	$(2.81 \pm 0.37) \times 10^4$	$(1.33 \pm 0.68) \times 10^4$	89.9±69.3
W5P22	$(6.17 \pm 0.24) \times 10^3$	$(6.76 \pm 1.57) \times 10^3$	$(5.95 \pm 18.10) \times 10^2$	9.6±70.0
W5P23	$(2.00 \pm 0.17) \times 10^4$	$(4.58 \pm 0.36) \times 10^4$	$(2.58 \pm 0.53) \times 10^4$	129.0±33.0
W5P24	$(1.73 \pm 0.16) \times 10^4$	$(3.01 \pm 0.59) \times 10^4$	$(1.28 \pm 0.75) \times 10^4$	74.0±55.9
W5P25	$(4.81 \pm 0.16) \times 10^3$	$(6.54 \pm 1.05) \times 10^3$	$(1.73 \pm 1.21) \times 10^3$	36.0±34.4
W5P26	$(2.67 \pm 0.43) \times 10^3$	$(6.31 \pm 0.84) \times 10^3$	$(3.64 \pm 1.27) \times 10^3$	136.3±59.4
W5P27	$(2.80 \pm 0.26) \times 10^4$	$(7.71 \pm 1.27) \times 10^4$	$(4.91 \pm 1.53) \times 10^4$	175.4±59.9
W5P28	$(7.90 \pm 0.53) \times 10^3$	$(2.12 \pm 0.21) \times 10^3$	$(-5.78 \pm 0.74) \times 10^3$	-(73.2±18.5)
W5P29	$(4.14 \pm 0.36) \times 10^3$	$(1.17 \pm 0.02) \times 10^4$	$(7.56 \pm 0.56) \times 10^3$	182.6±18.3
W5P30	$(3.71 \pm 0.22) \times 10^4$	$(7.08 \pm 0.27) \times 10^4$	$(3.37 \pm 0.49) \times 10^4$	90.8±19.7
W25P01~W25P02	0	0	0	-
W25P03	0	$(1.54 \pm 0.85) \times 10^1$	$(1.54 \pm 0.85) \times 10^1$	-
W25P04	0	0	0	-
W25P05	$(1.26 \pm 0.14) \times 10^4$	$(6.30 \pm 0.41) \times 10^3$	$(-6.31 \pm 1.81) \times 10^3$	-(50.0±36.6)
W25P06	$(1.60 \pm 0.12) \times 10^4$	$(1.52 \pm 0.03) \times 10^4$	$(-7.53 \pm 15.0) \times 10^2$	-(5.0±159.4)
W50P01~W50P02	0	0	0	-
W50P03	$(1.43 \pm 0.13) \times 10^4$	$(1.16 \pm 0.40) \times 10^4$	$(-2.68 \pm 5.30) \times 10^3$	-(18.9±85.2)
W100P01	0	0	0	-
W100P02	$(7.14 \pm 0.65) \times 10^3$	$(6.13 \pm 2.05) \times 10^3$	$(-1.01 \pm 2.70) \times 10^3$	-(14.1±102.2)
W100P03	$(7.14 \pm 0.65) \times 10^3$	$(2.81 \pm 0.32) \times 10^3$	$(-4.33 \pm 0.97) \times 10^3$	-(60.6±28.6)
W150P01	$(4.76 \pm 0.43) \times 10^3$	$(3.49 \pm 0.86) \times 10^3$	$(-1.27 \pm 1.29) \times 10^3$	-(26.7±61.0)

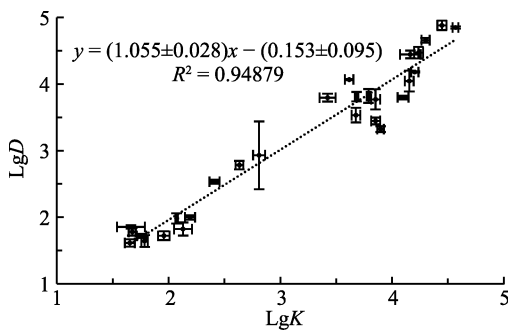


图 1 并样的 EHP 载量的定量检测值与并样组已知量的相关性

Fig.1 The correlation between of the detected amounts and the known amounts of EHP in pooling groups

LgK: 根据单样品检测求出的并样组 EHP 量的对数;

LgD: 检测到的并样组 EHP 量的对数

LgK: The logarithmic of EHP amount of the pooled samples calculated from the data of single samples;

LgD: The logarithmic of EHP amount of the pooled samples directly detected

究所海水养殖病害防控与分子病理学实验室建立的 EHP 的 TaqMan 探针 qPCR 方法,比套式 PCR 和 SYBR

Green qPCR 方法有更高的灵敏性和特异性(Liu *et al*, 2018)。在此基础上,本研究用海阳和潍坊养殖场采集的凡纳滨对虾样品分别进行 5 : 1、25 : 1、50 : 1、100 : 1 和 150 : 1 并样检测。由于并样率越高,样本越低,为了避免使用大量单个个体在高比例并样时数据量过低使结果难以统计比较,本研究采用了设定不同临界循环数的假定灵敏度的方式对 qPCR 定量结果进行定性分析的方法,从而使每个样品的 1 次 qPCR 的定量结果能产生 16 个可定性分析的数据,模拟了样品中存在高于和低于临界目标核酸量时所产生的多种组合状态。

对并样阳性率的分析表明,并样率越高,并样检测所得到的阳性率也越高。推算单样本感染率均值(r)可以通过并样数(n)和并样阳性率(r_p),经公式 $r=1-(1-r_p)^{1/n}$ 估测,方差(v)通过公式 $v=[r_p(1-r_p)^{(2/n-1)}]/(n^2T)$ 计算,其中, T 为样品总数(Kline *et al*, 1989; 顾卫东, 1998),上述关系对于较高阳性率或较高并样率的情况误差很大,用本研究中海阳和潍坊的 5 : 1 并样的已知阳性率推算的单样本感染率与实际数据的差异系数达 25%~71%。从本研究的数据

来看, 并样的阳性率符合“较低并样率的阳性率 \leq 较高并样率的阳性率 \leq 较低并样率的阳性率 \times 较高并样率/较低并样率”的关系。

对 EHP 的并样检测来说, 更重要的结果是得出采样群体内是否有阳性存在。群体中流行率越高, 所需的采样率越低(Ossiander *et al*, 1973)。本研究的定性分析揭示, 样品个体阳性率 $>20\%$ 时, 5:1~150:1 的各并样组检测到的阳性率与已知情况完全一致; 但在样品中个体阳性率 $<20\%$ 时, 并样检测结果会出现差异。在潍坊样品中, 阳性率 $\leq 10/150$ 时, 100:1~150:1 并样均无法有效检出阳性, 但 50:1 以下的并样有较稳定的检出; 阳性率 $\leq 6/150$ 时, 25:1 以上的并样均无法检出阳性; 阳性率 $\leq 2/150$ 时, 所有并样均无法检出阳性。在海阳的样品中, 阳性率 $\leq 4/25$ 时, 25:1 的并样无法有效检出阳性, 阳性率 $\leq 2/25$ 时, 5:1 以上的并样均无法检出阳性。考虑到不同流行率所需的采样率(Ossiander *et al*, 1973), 由上述情况推测, 如果 1 个群体只进行 1 个检测反应, 则最灵敏的情况只能检出群体中 7%以上的阳性率, 应采集 50 尾样品合并为 1 个并样检测; 而如果该群体的平均 EHP 载量在 10^2 copies/ng HpDNA 的水平, 则可能只能检出 16%以上的阳性, 应采集 25 尾对虾合并为 1 个并样检测。Muñoz-Zanzi 等(2000)通过成本分析表明, 对牛群的并样检测的最低成本与并样率和疫病流行率有关, 流行率在 0.5%~3.0%范围内, 最低成本的并样率在 15:1~6:1 范围。

前人数多数采用数理统计计算对并样开展研究。在并样检测灵敏度和特异性方面, 滕海英等(2011)研究了给定灵敏度和特异性下并样方法对提高总阳性率的估计精度的作用。Muñoz-Zanzi 等(2006)对影响并样检测的灵敏度和特异性的流行率、并样率、感染动物的病原浓度和检测方法的检测限等参数进行了推演。本研究则结合实际检测数据, 统计假定灵敏度下所得出的已知阳性、已知阴性、检测阳性和检测阴性的数量, 根据 OIE 诊断方法验证标准(OIE, 2017)计算得出各并样模式下的诊断灵敏度和诊断特异性。结果表明, 无论哪种并样模式均有很好的诊断特异性; 而诊断灵敏度在 5:1~50:1 并样率下均不低于 80%, 5:1 和 50:1 的诊断灵敏度十分接近, 但 100:1~150:1 的诊断灵敏度有明显下降。从这一分析来看, OIE 标准和美国标准规定并样不超过 5 个个体的要求(OIE, 2017; FHS, 2014), 在多数情况下可以考虑扩展到 50 个个体。

EHP 感染的风险与其载量有较强的关系(刘珍等, 2016), 定量分析对于 EHP 检测具有重要意义。本研

究观察到并样检测的定量结果与单一个体检测的平均值具有极显著相关性($P=2.64\times 10^{-19}$), 测定值与个体平均值的比在 0.27~2.29 范围, 处于同一数量级, 可以为群体量的测定提供参考。

综上所述, 通过基于 TaqMan qPCR 的 EHP 检测的并样分析, 在定性上国际标准中推荐的 5:1 并样检测方式可以扩展到 50:1 的检测方式, 可为群体中存在 7%以上的感染率提供兼顾准确性和低成本的检测方案, 其诊断特异性和诊断灵敏度与 5:1 并样检测接近, 可以缩短检测时间, 节省检测费用。更低感染率的检测应通过增加检测反应数量实现, 简单提高并样率反而会降低有效检测的能力; 并样检测的定量结果能用于群体感染载量水平的粗略评估。并样检测评估为水生动物疫病诊断和流行病学调查提供了参考依据。

参 考 文 献

- Arnold ME, Mueller-Doblies D, Carrique-Mas JJ, *et al*. The estimation of pooled-sample sensitivity for detection of *Salmonella* in turkey flocks. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107(3): 936–943
- Chayaburakul K, Nash G, Pratanpipat P, *et al*. Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004, 60(2): 89–96
- FHS. Suggested procedures for the detection and identification of certain finfish and shellfish pathogens. American Fisheries Society, 2014, <http://www.afs-fhs.org/bluebook/bluebook-index.php>
- Gu WD. Estimation of vector prevalence by using pool sampling. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 1998, 16(1): 29–33 [顾卫东. 混合样本方法估测媒介感染率. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 1998, 16(1): 29–33]
- Kline RL, Brothers TA, Brookmeyer R, *et al*. Evaluation of human immunodeficiency virus seroprevalence in population surveys using pooled sera. *Journal of Clinical Microbiology*, 1989, 27(7): 1449–1452
- Liu YM, Qiu L, Cheng DY, *et al*. The relationship of body length and weight in the *Litopenaeus vannamei* populations detected *Enterocytozoon hepatopenaei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(4): 96–103 [刘雅梅, 邱亮, 程东远, 等. 检出虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*)的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)群体的体长和体重关系. *渔业科学进展*, 2017, 38(4): 96–103]
- Liu YM, Qiu L, Sheng AZ, *et al*. Quantitative detection method of *Enterocytozoon hepatopenaei* using TaqMan probe real-time PCR. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2018, 151:

- 191–196
- Liu Z, Zhang QL, Wan XY, *et al.* Development of real-time PCR assay for detecting microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* and the application in shrimp samples with different growth rates. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(2): 119–126 [刘珍, 张庆利, 万晓媛, 等. 虾肝肠胞虫 (*Enterocytozoon hepatopenaei*) 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及对虾样品的检测. *渔业科学进展*, 2016, 37(2): 119–126]
- Muñoz-Zanzi CA, Johnson WO, Thurmond MC, *et al.* Pooled-sample testing as a herd-screening tool for detection of bovine viral diarrhea virus persistently infected cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2000, 12(3): 195–203
- Muñoz-Zanzi C, Thurmond M, Hietala S, *et al.* Factors affecting sensitivity and specificity of pooled-sample testing for diagnosis of low prevalence infections. *Preventive Veterinary Medicine*, 2006, 74(4): 309–322
- OIE. Manual of diagnostic tests for aquatic animals. 2017, <http://www.oie.int/international-standard-setting/aquatic-manual/access-online/>
- Ossiander FJ, Wedemeyer G. Computer program for sample sizes required to determine disease incidence in fish populations. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 1973, 30(9): 1383–1384
- Rovira A, Cano JP, Muñoz-Zanzi C. Feasibility of pooled-sample testing for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antibodies on serum samples by ELISA. *Veterinary Microbiology*, 2008, 130(1): 60–68
- Suebsing R, Prombun P, Srisala J, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification combined with colorimetric nanogold for detection of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei*, in penaeid shrimp. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, 114(5): 1254–1263
- Tangprasitipap A, Srisala J, Chouwdee S, *et al.* The microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* is not the cause of white feces syndrome in whiteleg shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *BMC Veterinary Research*, 2013, 9(1): 139
- Teng HY, Zhang LM, Sun QW, *et al.* Pooled sampling method under given sensitivity and specificity in improving accuracy of point estimator of population rate. *Academic Journal of Second Military Medical University*, 2011, 32(1): 72–75 [滕海英, 张罗漫, 孙庆文, 等. 给定灵敏度和特异度下混合样本方法对提高总体率点估计精度的作用. *第二军医大学学报*, 2011, 32(1): 72–75]
- Tourtip S, Wongtripop S, Stentiford GD, *et al.* *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (Microsporida: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): Fine structure and phylogenetic relationships. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2009, 102(1): 21–29
- Williams CJ, Moffitt CM. A critique of methods of sampling and reporting pathogens in populations of fish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2001, 13(4): 300–309

(编辑 马瑾艳)

Evaluation on the Detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* in Pooled DNA Samples of *Litopenaeus vannamei* Based on TaqMan qPCR

SONG Zenglei^{1,2}, DONG Xuan², ZHAO Ruoheng³, WANG Xiuhua²,
WU Heying^{1,2}, YU Danghui^{1,2}, XIE Guosi², HUANG Jie^{1,2}^①

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306. 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao); Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity; Qingdao 266071; 3. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023)

Abstract Two populations of *Litopenaeus vannamei* from Haiyang and Weifang in Shandong Province were sampled. TaqMan qPCR was used to measure *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in the shrimp hepatopancreas one by one, and then the extracted DNA samples were pooled by 5-pool (5 : 1), 25-pool (25 : 1), 50-pool (50 : 1), 100-pool (100 : 1), and 150-pool (150 : 1) to test the EHP in the pooled samples. The amplification used a special threshold cycle value (C_t) of samples lower/higher than an assumed critical cycle value (C_a), differentiated as an analyzed positive/negative ratio in the single sample test and pooled sample test. The relationship between different pooling modes and the analyzed positive rate, diagnostic sensitivity, diagnostic specificity, and quantitative accuracy were compared. The results showed that the detection for high pooling rate samples could be reduced in very low analytic sensitivity. When the positive rate of individuals in the pooled samples was above 30%, the detection results of the high pooling rate were consistent with that of the single sample detection. If the positive rate of individuals with heavy infections in the pooled sample were not less than 6.7%, satisfying results could be obtained in the sample with a pooling rate below 50 : 1; while the positive rate of individuals with light infections in the pooled sample were not less than 16%, the satisfying result could be obtained in the sample with a pooling rate below 25 : 1. The pooled samples with a positive rate below 1.3% of individuals with heavy infection, or a positive rate below 8% of individuals with light infection, might lead to false negative results in all pooling rates. All of the pooling modes have good diagnostic specificity. The sample with a 50 : 1 pooling rate had a similar diagnostic sensitivity to the sample with a 5 : 1 pooling rate, which is the highest pooling rate recommended by the OIE standard. It had a very significant correlation between the mean of the detected EHP load of pooled sample, and the mean of the known EHP load calculated according to the single sample, with a ratio of 0.27~2.83. The quantitative test results of the pooled samples could roughly reflect the average EHP load of the single sample at the order of magnitude. This study provides a reference for sample detection in aquatic animal disease diagnosis, and epidemiological investigations.

Key words *Litopenaeus vannamei*; *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP); qPCR; Pooled sample detection

① Corresponding author: HUANG Jie, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180421001

http://www.yykxjz.cn/

邹培卓, 杨倩, 董宣, 谢国驹, 黄捷. 用于水生病原菌的3种高通量活菌计数方法的比较. 渔业科学进展, 2019, 40(3): 133-140
Zou PZ, Yang Q, Dong X, Xie GS, Huang J. Comparison of three high-throughput viable counting techniques for aquatic pathogenic bacteria. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(3): 133-140

用于水生病原菌的 3 种高通量 活菌计数方法的比较*



邹培卓^{1,2} 杨倩² 董宣² 谢国驹² 黄捷^{1,2①}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 青岛 266071)

摘要 以一株副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)作为研究对象, 比较了 MTT [3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐]比色法、ATP 生物发光法和高通量生长曲线法在活细菌高通量计数上的应用效果。用 96 孔培养板进行不同浓度细菌活菌计数, 确定了上述 3 种方法在副溶血弧菌活菌计数的标准曲线和线性范围。结果显示, 副溶血弧菌的 MTT 比色法以 DMSO 溶解的 MTT 产物甲瓚在 555 nm 的吸光度($OD_{555\text{ nm}}$)为计数依据, 活菌数的对数(LgC)与 $LgOD_{555\text{ nm}}$ 线性关系的标准曲线为 $LgC=(1.0439\pm 0.0200)LgOD_{555\text{ nm}}+(8.0565\pm 0.0125)$, 相关系数 $R^2=0.9965$, 线性检测范围为 $7.8\times 10^6\sim 2.5\times 10^8$ CFU/ml; ATP 生物发光法以 ATP 产生的相对发光度值(RLU)为计数依据, LgC 与 LgRUL 线性关系的标准曲线为 $LgC=(0.9590\pm 0.0065)LgRLU+(0.9949\pm 0.0366)$, 相关系数 $R^2=0.9994$, 线性检测范围为 $1.0\times 10^4\sim 3.0\times 10^8$ CFU/ml; 高通量生长曲线法以生长曲线达到拐点的时间(T_s)为计数依据, LgC 与 T_s 线性关系的标准曲线为 $LgC=-(0.8727\pm 0.0230)T_s+(9.0128\pm 0.1572)$, 相关系数 $R^2=0.9924$, 线性检测范围为 $1.0\times 10^0\sim 1.0\times 10^7$ CFU/ml。用 3 种方法对实际菌液测量并与平板计数法比较表明, ATP 生物发光法与高通量生长曲线法有很好的准确性, MTT 比色法准确度稍差, 而高通量生长曲线法有最宽的线性范围, 也最适合高通量测定。

关键词 活菌计数; MTT 比色法; ATP 生物发光法; 高通量生长曲线法

中图分类号 S947.9 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)03-0133-08

细菌计数方法是微生物学研究的基础技术, 主要分为直接计数法和间接培养计数法。直接计数法主要有显微镜观察法(包括光学显微镜技术、荧光显微镜技术等)和比浊计数法等; 间接培养计数法主要有平板菌落计数法(包括传统平板计数法、微菌落技术等)

和最大或然数计数法(Most probable number, MPN 法, 也称为稀释培养法)等(王婷婷等, 2008)。传统的直接计数法不能区分细菌的死活, 且灵敏度低、线性范围狭窄, 间接培养计数法虽然能确定活菌数量, 但工作量大, 难以对大批量样品进行同时操作。例如,

* 中国东盟海上合作基金项目(2016~2018)、现代农业产业技术体系(CARS-48)和中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2017HY-ZD10)共同资助[This work was supported by China ASEAN Maritime Cooperation Fund Project (2016~2018), China Agriculture Research System (CARS-48), and Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Chinese Academy of Fishery Sciences (2017HY-ZD10)]. 邹培卓, E-mail: zoupz1992@163.com

① 通讯作者: 黄捷, 研究员, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-04-21, 收修改稿日期: 2018-05-02

食品安全国家标准中的菌群计数法采用 MPN 法和平板计数法(GB 4789.3-2010),这 2 种方法都需要培养 24~48 h,且工作量大、检测线性范围窄,难以进行快速、大批量的检测工作,MPN 法的精确性还存在疑问;为了简化检测程序、缩短检测时间,国内外学者进行了大量的快速检测方法的研究,提出了电阻抗检测法、Sim Plate™全平皿计数法、微菌落技术、最大或然数-聚合酶链式反应计数法(MPN-PCR 法)、流式细胞仪测定法等检测方法,取得了一定的成果,但也存在不同的缺陷和不足。例如,流式细胞仪测定法虽然灵敏度、简便性都有了较大的提升,但由于其成本昂贵,且不能区分细菌的死活,在实际应用中受到了很大的制约。

MTT 是 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐,能穿过细胞膜被活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶还原,形成蓝紫色不溶于水的甲瓩(Formazan)(Mosmann, 1983),死细胞酶活性丧失而没有颜色反应。用有机溶剂溶解甲瓩后(边兴艳, 1998),测定溶液的吸光度(OD 值)而确定活细胞数(Gerlier *et al.*, 1986)。该法快速、经济、操作相对简便、重复性较好,近年来被广泛应用到大肠杆菌(*Escherichia coli*) (王栩等, 2002)、保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*)、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*) (黄立坤等, 2008)、伴放线菌嗜血菌(*Haemophilus actinomycetemcomitans*) (王忠朝等, 2010)和酵母菌(龚加路等, 2016)等的活菌计数中。

三磷酸腺苷(ATP)是所有生命活动的能量载体(Velten *et al.*, 2007),活细菌中 ATP 含量会维持在一定范围,细菌死亡后 ATP 会在短时间内被细胞内酶所分解(Holm-Hansen *et al.*, 1966),样品中 ATP 含量即可间接反映活细菌数量。ATP 生物发光法(Miller *et al.*, 1992; Selan *et al.*, 1992; Nyrén, 1994; McElroy *et al.*, 1949)是荧光素酶在 Mg^{2+} 条件下催化荧光素与 ATP 反应形成荧光素-AMP 的复合物,与 O_2 结合时发光,发光强度与 ATP 浓度呈线性关系,从而检测活菌的数量(Moyer *et al.*, 1983; Grönroos *et al.*, 1983)。ATP 生物发光法操作简便,能快速得到结果,与传统的平板计数法相比,不仅能区分细菌的死活,而且还能检测出不可培养的微生物(Hammes *et al.*, 2010)。

借鉴实时定量 PCR 的扩增曲线原理,利用微生物类似于 PCR 扩增的指数生长曲线(Brewster, 2003),建立了高通量生长曲线法,该法与传统的 MPN 法完全不同,是根据细菌生长达到特定浊度的时间进行活菌的计数,在微孔板的微量培养体积上,设置多个平行,以高通量的方式对微生物的生长进行实时监测,

达到类似实时定量 PCR 那样在极宽的线性范围进行微生物的准确计数的效果。在上述背景下,本研究对 MTT 比色法、ATP 生物发光法和高通量生长曲线法进行了比较。

1 材料与方 法

1.1 细菌

实验用副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)的编号为 20130629002S01(以下简称 2S01),取自中国水产科学研究院黄海水产研究所养殖生物疾病控制与分子病理学研究室(王娜等, 2016; Dong *et al.*, 2017)。将冻存的 2S01 菌株在胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)平板上划线,28℃培养 12 h,挑取单个菌落接种于胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)中,于 28℃以 110 r/min 过夜振荡培养,3000 r/min 离心 10 min,并用磷酸缓冲溶液(PBS)清洗沉淀、重悬,调整其 $OD_{600\text{ nm}}=0.5$,经平板计数方法检测其浓度约为 1.12×10^8 CFU/ml。取 2 ml 接种于 200 ml TSB 培养基中,在 28℃以 110 r/min 恒温震荡培养 4~6 h,待细菌刚达到指数生长期时,用冷冻离心机 4℃离心 3 次,并用 PBS 溶液清洗沉淀、重悬,调整其 $OD_{600\text{ nm}}=0.5$,备用。

1.2 MTT 比色法

1.2.1 检测波长确定 将 100 μl 重悬菌液加入 96 孔细胞培养板(Corning, 美国),然后每孔加入 20 μl 5 mg/ml 的 MTT 溶液(溶于 PBS 溶液并经 0.22 μm 滤膜过滤除菌)(Solarbio),用微孔板振荡仪混匀,放入 37℃恒温培养箱孵育 2 h,取出后于 4000 r/min 离心 10 min,吸出上清液,每孔加入 150 μl DMSO (Solarbio, 中国),振荡混匀 10 min,设定 Varioskan Flash 全波长扫描式多功能读数仪(Thermo, 美国)波长在 400~700 nm 范围内进行波长扫描,只加 DMSO 作为空白对照组,每组 3 个平行。

1.2.2 MTT 溶液的使用剂量 在相同量的菌液中分别加入终浓度为 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50 mg/ml 的 MTT 溶液,充分反应后离心,弃上清液,每组 3 个平行,按 MTT 比色法的步骤测量各组 OD 值。

1.2.3 干扰物质的影响 以 DMSO 为参比,以 PBS 溶液和 121℃灭菌 20 min 的死亡菌体为样品,用 MTT 法测量,每组 3 个平行。

1.2.4 MTT 溶液与菌液反应时间 分别将 MTT 法的 37℃孵育反应经 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 h 后,离心弃上清液,终止反应,每组 3 个平行,

按上述方法测量各组 OD 值。

1.2.5 检测范围与标准曲线 将浓度为 1×10^9 CFU/ml 的菌悬液按 2 倍浓度梯度依次稀释为 $9.77 \times 10^5 \sim 1 \times 10^9$ CFU/ml, 每组 3 个平行, 用 MTT 法测量各组 OD 值, 用 SigmaPlot 12.0 软件进行数据分析, 用 Polynomial 进行线性分析, 建立菌液浓度与其反应后 OD 值的标准曲线。

1.3 ATP 生物发光法

1.3.1 试剂盒可靠性检测 按增强型 ATP 检测试剂盒(Beyotime)说明书操作步骤用试剂盒提供的 ATP 标准品进行试剂盒验证, 并建立标准曲线。

1.3.2 检测范围与标准曲线 将调整 OD 后的菌液稀释成浓度为 3×10^3 、 1×10^4 、 3×10^4 、 1×10^5 、 3×10^5 、 1×10^6 、 3×10^6 、 1×10^7 、 3×10^7 、 1×10^8 、 3×10^8 、 1×10^9 CFU/ml 的菌悬液, 然后按照试剂盒说明书测量各组相对发光度值(RLU), 每组 3 个平行, 建立菌液浓度与其反应后 RLU 的标准曲线。

1.4 高通量生长曲线法

1.4.1 不同浓度菌液连续培养进行 OD 值测定 将调整 OD 后的菌液稀释成 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 CFU/ml 的菌悬液, 每个梯度取 2 μ l, 用 8 通道移液器加至预先加有 198 μ l TSB 培养基的 96 孔板中, 每个浓度 3 个重复, 设置 PBS 空白对照, 用涡旋振荡仪混匀, 放入 28 $^{\circ}$ C 恒温培养箱, 300 r/min 振荡培养。在培养的 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 h 测定 OD_{600 nm}。

1.4.2 建立标准曲线 将细菌培养时间和 OD_{600 nm} 的读数扣除未接种细菌的培养基孔的 OD_{600 nm} 值, 用 SigmaPlot 12.0 软件进行数据分析, 按 Sigmoid 曲线类型用 3 参数模式拟合, 根据拟合出的方程, 统计其各组菌液生长曲线达到 a/2 值的时间 x0, 建立菌液浓度与该时间的标准曲线。

1.5 副溶血弧菌菌液的测量

取 10 份不同浓度的副溶血弧菌菌液, 分别用 3 种计数方法与平板计数法进行对比, 分析 3 种计数方法的计数结果(C)与平板计数法的计数结果(C_P)的线性关系和变异系数(C.V.)。

$$C.V. = (C - C_P) / C_P \times 100\%$$

2 实验结果

2.1 MTT 比色法

2.1.1 检测波长 MTT 经细菌产物呈蓝紫色,

将培养的副溶血弧菌悬液进行波长扫描(图 1), 结果显示, 蓝紫色产物的最大吸收峰值在 550~560 nm 之间。DMSO 的吸光度对实验组吸光度影响很小, 且没有峰值出现, 属于背景吸收, 因此, 将 MTT 法的检测波长定为 555 nm。

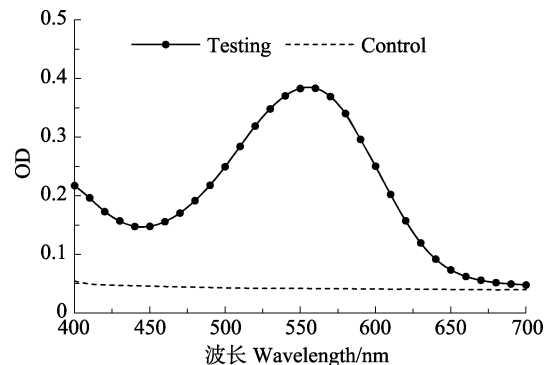


图1 MTT 产物甲瓩的光吸收检测波长扫描
Fig.1 The scanning of photoabsorption detection wavelength of formazan produced by MTT

2.1.2 MTT 溶液的使用剂量 设定不同的 MTT 用量进行分析, 结果显示(图 2), 当细菌反应液中 MTT 浓度为 0.2 mg/ml, 产生甲瓩沉淀的量最多, 甲瓩的吸收曲线呈现峰值, 因此, 将 MTT 终浓度定为 0.2 mg/ml。MTT 量超过 0.2 mg/ml 时, 产生的甲瓩量会逐渐减少。

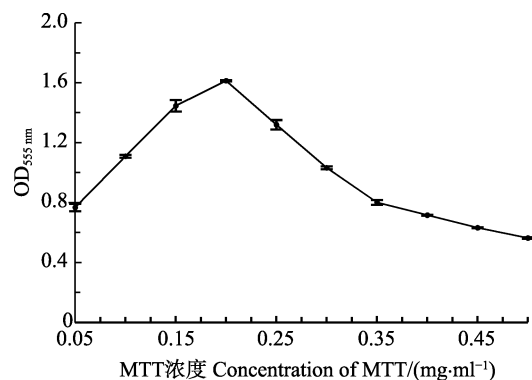


图2 MTT 浓度对检测结果的影响
Fig.2 Effects of the MTT concentration on the measuring results

2.1.3 干扰物的影响 以 DMSO 为参照, 用 PBS 或灭活菌体作为样品进行 MTT 反应检测, 所得的检测值很低(表 1), 经 *t* 检验, 得出 3 组数据两两间均无显著差异($P > 0.05$), 因此, 可以忽略这些干扰物对实验结果的影响。

2.1.4 反应时间的影响 细菌与 MTT 的反应时间在 0.5~2 h 时, 形成甲瓩的量在逐渐增多, 2 h 后维持在相对稳定的数量(图 3), 因此, 将反应时间定为 2 h。

表1 不同干扰物以 DMSO 为对照时的 OD 值
Tab.1 OD value of the different interfering substances compared with DMSO

干扰物 Interfering substance	DMSO	PBS	灭活菌液 Deactivated bacteria
OD 值 OD _{555 nm}	0.0393±0.0012	0.0423±0.0049	0.0502±0.0038

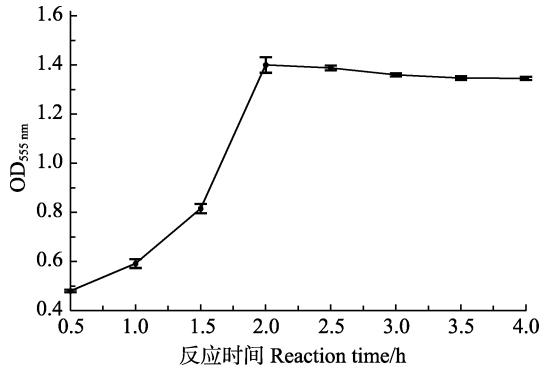


图3 反应时间对检测结果的影响

Fig.3 Effects of reaction time on the measuring results

2.1.5 检测范围 通过选择上述参数,用优化的 MTT 法在微孔板中进行副溶血弧菌的高通量活菌计数,用 SigmaPlot 的 Polynomial 线性分析,当菌液浓度为 $7.81 \times 10^6 \sim 2.50 \times 10^8$ CFU/ml 时,其对应的 OD_{555 nm} 值与活菌数的线性关系极显著,线性范围跨度约为 2 个细菌浓度数量级,其关系式为 $LgC = (1.0439 \pm 0.0200)LgOD_{555 nm} + (8.0565 \pm 0.0125)$, $R^2 = 0.9965$ (图 4)。

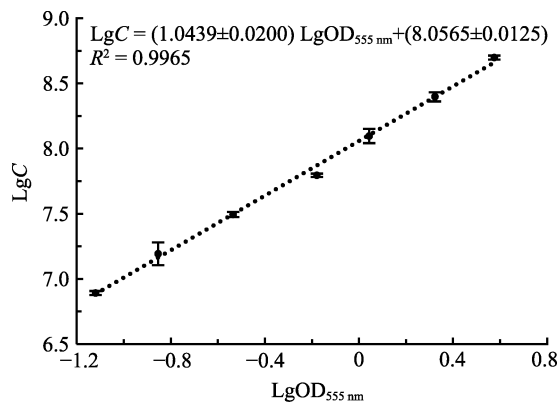


图4 菌液浓度对数 LgC 与 OD 值对数 LgOD_{555 nm} 的标准曲线

Fig.4 Standard curve between the logarithmic concentration of bacteria (LgC) and logarithmic OD_{555 nm} value (LgOD_{555 nm})

2.2 ATP 生物发光法

2.2.1 ATP 标准溶液的标准曲线 用增强型 ATP 检测试剂盒对 ATP 标准溶液进行检测,ATP 标准溶液浓度在 $1.0 \times 10^{-1} \sim 1.0 \times 10^4$ nmol/L 时,ATP 浓度的对数(LgATP)与发光强度对数(LgRLU)的线性关系极显

著,其关系式为 $LgATP = 1.0509LgRLU - 4.3223$, $R^2 = 0.9974$ (图 5),表明该试剂盒在该范围内的测定结果可靠。

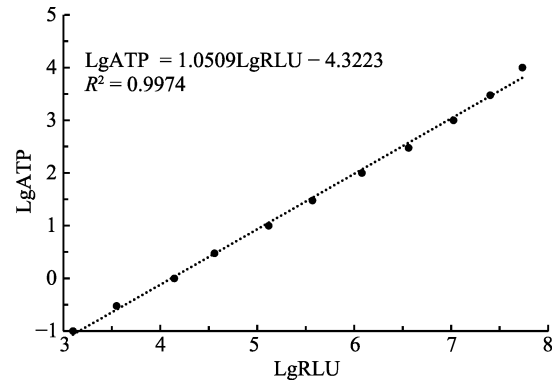


图5 ATP 浓度对数(LgATP)与相对发光强度(RLU)对数(LgRLU)的标准曲线

Fig.5 Standard curve between the logarithmic concentration of ATP (LgATP) and logarithmic relative intensity of luminescence(LgRLU)

2.2.2 菌液浓度对数 LgC 与相对发光强度对数 LgRLU 的标准曲线 用增强型 ATP 试剂盒对已知浓度的副溶血弧菌样品进行检测,用 SigmaPlot 的 Polynomial 线性分析,当菌液浓度在 $1.0 \times 10^4 \sim 3.0 \times 10^8$ CFU/ml 时,其对应的相对发光强度对数(LgRLU)与活菌数对数(LgC)的线性关系极显著,线性范围跨度约为 4.5 个细菌浓度数量级,其关系式为 $LgC = (0.9590 \pm 0.0065)LgRLU + (0.9949 \pm 0.0366)$, $R^2 = 0.9994$ (图 6)。

2.3 高通量生长曲线法

将浓度为 $1.0 \times 10^0 \sim 1.0 \times 10^7$ CFU/ml 的副溶血弧菌加到预先加有培养基的多孔板中,每隔 1 h,测定 OD_{600 nm} 值,扣除未接种细菌孔的 OD_{600 nm} 后,得出各初始浓度的细菌吸光度所代表的生长变化,可看到这些生长变化都呈 S 形(Sigmoid)曲线分布,不同浓度的 S 曲线在拐点处的生长速率基本接近,经 SigmaPlot 的 Sigmoid 曲线类型 3 参数模式拟合,得到各初始浓度的细菌生长曲线(图 7)。用 SigmaPlot 的 Polynomial 线性分析,取各浓度拟合曲线的拐点时间参数(T_s),即为生长达到最大值的 50% 的生长时间,该时间在所测定的初始细菌浓度范围内均与活菌数的对数值

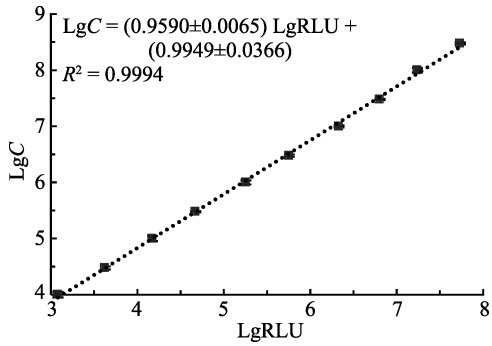


图 6 菌液浓度对数 LgC 与相对发光强度对数 LgRLU 的标准曲线

Fig.6 Standard curve between the logarithmic concentration of bacteria (LgC) and logarithmic intensity of luminescence(LgRLU)

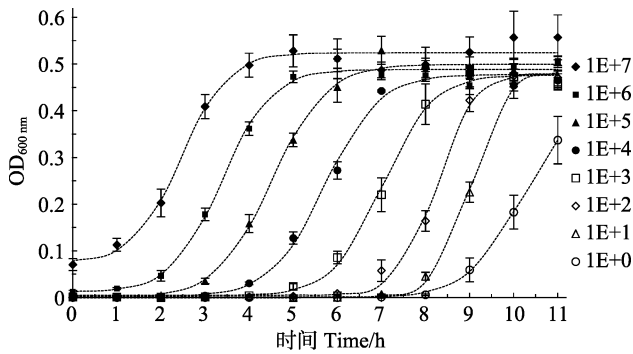


图 7 各初始浓度菌液的生长曲线

Fig.7 Growth curve of each initial concentration of bacteria

(LgC)具有极显著的线性关系, 线性关系跨度达 7 个数量级, 其关系式为 $LgC = -(0.8727 \pm 0.0230)T_s + (9.0128 \pm 0.1572)$, $R^2 = 0.9924$ (图 8)。

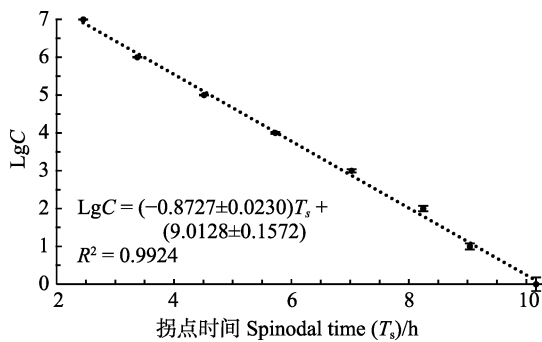


图 8 菌液浓度 LgC 与生长曲线的拐点时间(T_s)的标准曲线

Fig.8 Standard curve between the concentration of bacteria (LgC) and the spinodal time (T_s) of growth curves

2.4 副溶血弧菌菌液检测

分别采用 MTT 比色法、ATP 发光法和高通量生长曲线法对 10 份不同浓度的副溶血弧菌菌液进行检

测, 并与平板计数法进行比较(图 9)。结果显示, MTT 法计数的 9 个在线性范围内的样品计数值的对数 (LgC_{MTT})与平板计数法结果的对数(LgC_P)之间具有极显著的线性关系($R^2=0.9620$, $P=3.42 \times 10^{-7}$), 其关系式为 $LgC_{MTT}/LgC_P=1.0123$ (图 9)。9 个样品的变异系数为 $(18.50 \pm 12.03)\%$, 超出检测线性范围的 1 个样品的浓度为 4.82×10^6 CFU/ml, 其变异系数为 36.61%。ATP 发光法计数的 9 个在线性范围内的样品计数值的对数(LgC_{ATP})与平板计数法的结果的对数(LgC_P)之间具有极显著的线性关系($R^2=0.9981$, $P=1.72 \times 10^{-11}$), 其关系式为 $LgC_{ATP}/LgC_P=0.9981$ (图 9)。9 个样品的变异系数为 $(8.59 \pm 5.90)\%$, 超出检测线性范围的 1 个样品的浓度为 6.43×10^3 CFU/ml, 其变异系数为 23.65%。高通量生长曲线法计数的 9 个在线性范围内的样品计数值的对数(LgC_G)与平板计数法结果的对数(LgC_P)之间具有极显著的线性关系($R^2=0.9985$, $P=3.89 \times 10^{-11}$), 其关系式为 $LgC_G/LgC_P=0.9985$ (图 9)。9 个样品的变异系数为 $(9.78 \pm 7.46)\%$, 超出线性范围的 1 个样品的浓度为 77.00 CFU/ml, 其变异系数为 68.43%。

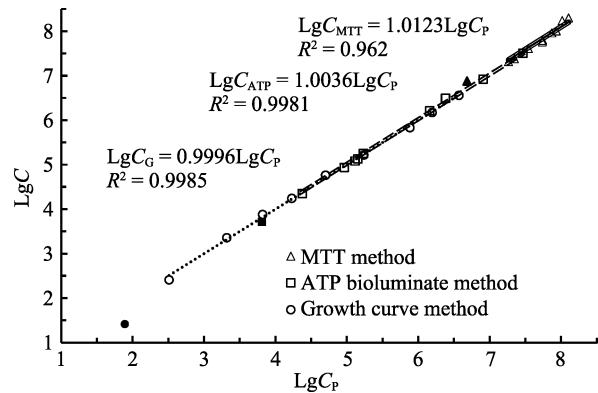


图 9 3 种高通量活菌计数法与平板计数法的结果比较
Fig.9 Comparison of logarithmic counting value three high throughput counting methods for living bacteria(LgC) and logarithmic value of plate counting (LgC_P)

上述 3 种方法与平板计数法的比较显示, ATP 发光法和高通量生长曲线法的曲线斜率很接近 1, 说明这 2 种方法与平板计数法得出的结果高度接近, 而 MTT 法的斜率与 1 有所偏离, 而且在偏低或偏高浓度上有明显系统误差, 说明这一方法所得结果存在一定误差。

3 讨论

平板计数作为活菌计数的最基本方法, 通常能应用于大多数需要进行活菌计数的场合, 但在一些研究不同培养条件, 例如液体发酵(高戈等, 2017)或固体

发酵(孙静等, 2017)等; 理化因素, 例如消毒剂或紫外线等处理; 药物制剂, 例如中草药或抑菌剂等; 这些对特定细菌生长或存活的影响效果时, 需要大量的活菌计数工作, 而平板计数方法由于工作量大, 材料消耗大, 在用到这些大量研究对象时效率很低, 且不确定度高(凌云等, 2010), 因此, 需要高效可靠的活菌计数方法。工作效率较高的细菌计数法可采用酶标板的高通量 OD 值测定, 但该方法并不能区分样本中的活菌和死菌, 而且如果样本中存在大量带颜色的或悬浮物等干扰光吸收的物质时(孙静等, 2017), 就难以进行直接的 OD 值测定。因此, 需要其他的活菌计数方法以弥补在特定应用中的不足。

MTT 比色法操作相对简单, 能满足高通量操作的需求, 适用于较高浓度的活菌数检测, 但其检测的线性范围只有 2 个数量级的跨度。当活菌数较低时, MTT 的反应产物过低, 从而在 OD_{555 nm} 值太低而超出检测的线性范围, 不适用于检测浓度太低或太高的细菌, 由于高通量分析实验的场合常常会有细菌数量大大偏离 MTT 检测范围的情况发生, 这种方法实际上在高通量活菌计数的应用中受到了较大局限, 与之前报道的 MTT 比色法在大肠杆菌活菌计数研究的结论相符合(汪志荣等, 2011)。对 $7.8 \times 10^6 \sim 2.5 \times 10^8$ CFU/ml 线性范围内的实际样品进行检测时, 所得结果与平板计数结果有一定偏离, 5×10^6 CFU/ml 以下的检测结果可能会有明显偏差。此外, 不同种类和不同生理状态的细菌中琥珀酸脱氢酶含量可能不同, 对多种细菌混合检测的适用性可能受影响。

ATP 生物发光法操作更加简便, 是 3 种方法中检测速度最快的, 准确性比 MTT 法高, 反应速度较快, 能对样品进行实时的检测反馈, 线性范围能达到 4 个数量级的跨度。对 $1 \times 10^4 \sim 3 \times 10^8$ CFU/ml 跨度的线性范围内的实际样品进行检测时, 所得结果与平板计数结果高度吻合, 对 10^4 CFU/ml 以下的检测结果偏差明显增加(Chen *et al.*, 2006)。在检测较低浓度的活菌时, 需要较长的检测时间来收集微弱的发光, 对于大量样品的高通量检测来说, 顺序检测过程会造成前后样品的时间差太大, ATP 的发光会逐渐消散而对准确性造成显著影响(Selan *et al.*, 1992)。因此, 该方法也不适于大样本量的高通量检测。此外, 如果样品中有其他来源的 ATP 干扰, 也会对分析的准确性产生很大的影响。

高通量生长曲线法准确性略低于 ATP 发光法, 在本研究的手动操作条件下, 检测的线性范围达 7 个数量级以上, 对特别低或特别高的活菌数都能进行有

效检测。对 $10^0 \sim 10^7$ CFU/ml 跨度的线性范围内的实际样品进行检测时, 所得结果与平板计数结果高度吻合, 10^2 CFU/ml 以下的实际样品检测时有误差增大的可能, 与 Brewster(2003)的研究结果相符。高通量生长曲线法操作耗费时间较长, 而且需要定时对 OD 值进行测定, 如果完全人工手动操作, 这个过程将较为辛苦。该方法不需要借助特别试剂, 可以不受试剂缺乏的限制而得以应用。如果有自动生长曲线测定仪, 那这样的操作将十分方便, 而且能进一步增加其检测的线性范围和结果的准确性。

综合比较 3 种高通量方法: ATP 生物发光法与高通量生长曲线法有很好的准确性, MTT 比色法准确度稍差; 而高通量生长曲线法有最宽的线性范围, 也最适合高通量测定。

参 考 文 献

- Bian XY. MTT assay and its application. *International Journal of Laboratory Medicine*, 1998, 19(2): 83–85 [边兴艳. MTT 比色法及其应用. *国际检验医学杂志*, 1998, 19(2): 83–85]
- Brewster JD. A simple micro-growth assay for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 53(1): 77–86
- Chen FC, Godwin SL. Comparison of a rapid ATP bioluminescence assay and standard plate count methods for assessing microbial contamination of consumers' refrigerators. *Journal of Food Protection*, 2006, 69(10): 2534–2538
- Dong X, Bi DX, Wang HL, *et al.* *pirAB*^{VP}-bearing *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio campbellii* pathogens isolated from the same AHPND-affected pond possess highly similar pathogenic plasmids. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1859
- Gao G, Zhu KL, Zhang QQ, *et al.* Simplified fermentation of a functional probiotics and the application in prawn (*Litopenaeus vannamei*) bio-floc breeding. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(3): 140–147 [高戈, 朱开玲, 张庆起, 等. 一株功能益生菌的简易发酵及其在凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 生物絮团养殖中的应用. *渔业科学进展*, 2017, 38(3): 140–147]
- Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of Immunological Methods*, 1986, 94(1–2): 57–63
- Gong JL, Deng J, Wu HC, *et al.* Research on the optimum condition of MTT in yeast count. *China Condiment*, 2016(1): 10–14 [龚加路, 邓静, 吴华昌, 等. MTT 法在酵母菌活菌计数中最佳条件的研究. *中国调味品*, 2016(1): 10–14]
- Grönroos M, Mäenpää J, Nieminen AL, *et al.* 548 Correlation of steroid receptor contents with medroxyprogesterone and tamoxifen effects in endometrial cancer assayed by barin vitro ATP-bioluminescence method. *Journal of Steroid*

- Biochemistry, 1983, 19(S1): 194
- Hammes F, Goldschmidt F, Vital M, *et al.* Measurement and interpretation of microbial adenosine tri-phosphate (ATP) in aquatic environments. *Water Research*, 2010, 44(13): 3915
- Holm-Hansen O, Booth CR. The Measurement of adenosine triphosphate in the ocean and its ecological significance. *Limnology and Oceanography*, 1966, 11(4): 510–519
- Huang LK, Du P, Huo GC. Inquiring into the method of counting live germ with MTT. *Food Industry*, 2008(3): 62–65 [黄立坤, 杜鹏, 霍贵成. MTT法测定乳酸菌活菌数的研究. *食品工业*, 2008(3): 62–65]
- Ling Y, Wang LB, Shen H, *et al.* Uncertainty evaluation for plate counts of coliforms in foods. *Food & Machinery*, 2010, 26(5): 75–77 [凌云, 王李宝, 沈辉, 等. 食品中大肠菌群平板计数结果不确定度的评定. *食品与机械*, 2010, 26(5): 75–77]
- McElroy WD, Strehler BL. Factors influencing the response of the bioluminescent reaction to adenosine triphosphate. *Archives of Biochemistry*, 1949, 22(3): 420–433
- Miller JN, Nawawi MB, Burgess C. Detection of bacterial ATP by reversed flow-injection analysis with luminescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 1992, 266(2): 339–343
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 1983, 65(1–2): 55–63
- Moyer JD, Henderson JF. Nucleoside triphosphate specificity of firefly luciferase. *Analytical Biochemistry*, 1983, 131(1): 187–189
- Nyrén P. Apyrase immobilized on paramagnetic beads used to improve detection limits in bioluminometric ATP monitoring. *Luminescence*, 1994, 9(1): 29–34
- Selan L, Berlutti F, Passariello C, *et al.* Reliability of a bioluminescence ATP assay for detection of bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 1992, 30(7): 1739–1742
- Sun J, Song XL, Huang J. Optimization of fermentation conditions and analysis of the nutrition components of soybean meal fermented with *Bacillus firmus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(3): 163–171 [孙静, 宋晓玲, 黄健. 豆粕的坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)发酵工艺优化及其营养成分分析. *渔业科学进展*, 2017, 38(3): 163–171]
- Velten S, Hammes F, Boller M, *et al.* Rapid and direct estimation of active biomass on granular activated carbon through adenosine tri-phosphate (ATP) determination. *Water Research*, 2007, 41(9): 1973–1983
- Wang N, Wang HL, Bai N, *et al.* Isolation of lysogenic phage in *Vibrio parahaemolyticus* and its relationship with the pathogenicity of the host bacteria. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(2): 105–110 [王娜, 王海亮, 白楠, 等. 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)中溶源噬菌体与其宿主菌致病力的相关性. *渔业科学进展*, 2016, 37(2): 105–110]
- Wang TT, Deng TL, Liao MX. Discussions on the methodology of aquatic bacteria counting. *World Sci-Tech R & D*, 2008, 30(2): 138–142 [王婷婷, 邓天龙, 廖梦霞. 水生细菌计数方法研究进展及展望. *世界科技研究与发展*, 2008, 30(2): 138–142]
- Wang X, Wu YC, Xia SP, *et al.* Inquiring into the method of counting live germ with MTT. *Journal of Luzhou Medical College*, 2002, 25(4): 291–293 [王栩, 郇于川, 夏世平, 等. MTT法进行活菌计数的方法学探讨. *泸州医学院学报*, 2002, 25(4): 291–293]
- Wang ZC, Fan LY, Cai W, *et al.* Study on counting of *H. actinomycetemcomitans* by MTT colorimetric method. *Journal of Modern Medicine & Health*, 2010, 26(8): 1121–1123 [王忠朝, 范丽苑, 蔡炜, 等. MTT法用于检测伴放线菌嗜血菌的研究. *现代医药卫生*, 2010, 26(8): 1121–1123]
- Wang ZR, Gao Q, Ma CX, *et al.* Experimental study on the application of MTT colorimetric method in counting live *Escherichia coli*. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2011, 31(12): 2642–2650 [汪志荣, 高琼, 马传鑫, 等. MTT法测定大肠杆菌活菌数实验研究. *环境科学学报*, 2011, 31(12): 2642–2650]

Comparison of Three High-Throughput Viable Counting Techniques for Aquatic Pathogenic Bacteria

ZOU Peizhuo^{1,2}, YANG Qian², DONG Xuan², XIE Guosi², HUANG Jie^{1,2①}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao); Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Qingdao 266071)

Abstract Three viable counting methods, including MTT assay, ATP bioluminescence assay, and high-throughput growth curve assay, for live *Vibrio parahaemolyticus* were compared in a high-throughput manner on a 96-well culture plate. The standard curves and linear ranges of these three methods were determined. The results showed that the directly detected index of MTT assay is $OD_{555\text{ nm}}$, which is the absorption at 555 nm of DMSO-dissolved formazan produced from MTT. The liner standard curve for viable *V. parahaemolyticus* between logarithmic viable counts (LgC) and the logarithmic $OD_{555\text{ nm}}$ (Lg $OD_{555\text{ nm}}$) was $LgC=(1.0439\pm 0.0200)LgOD_{555\text{ nm}}+(8.0565\pm 0.0125)$, with a correlation index $R^2=0.9965$, and the linear detection range is $7.8\times 10^6\sim 2.5\times 10^8$ CFU/ml. The directly detected index of ATP bioluminescence assay is the relative luminescence unit (RLU), which is produced by ATP of viable cells. The liner standard curve between LgC and LgRUL was $LgC=(0.9590\pm 0.0065)LgRLU+(0.9949\pm 0.0366)$, with a correlation index $R^2=0.9994$, and the linear detection range is $1.0\times 10^4\sim 3.0\times 10^8$ CFU/ml. The directly detected index of the high-throughput growth curve method is the spinodal time (T_s), which is the time reaching the reflection point on the growth curve. The liner standard curve between LgC and T_s was $LgC=-(0.8727\pm 0.0230)T_s+(9.0128\pm 0.1572)$, with a correlation index $R^2=0.9924$, and a linear detection range of $1.0\times 10^0\sim 1.0\times 10^7$ CFU/ml. These three methods were used to measure 10 broths of *V. parahaemolyticus* and comparison with the plate counting method, respectively. The results showed both the ATP bioluminescence assay and the high-throughput growth curve method had satisfying accuracy, but the MTT assay had lower accuracy. The high-throughput growth curve has the widest linear range and is the most suitable for high throughput measurement.

Key words Viable counting; MTT assay; ATP bioluminescence assay; High-throughput growth curve method

① Corresponding author: HUANG Jie, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180420004

http://www.yykxjz.cn/

郭斌, 梁萌青, 徐后国, 卫育良, 张庆功, 李本相, 廖章斌. 江蓠、浒苔、藻渣和菌渣替代鱼粉对红鳍东方鲀幼鱼生长性能、相关生化指标的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(3): 141-150

Guo B, Liang MQ, Xu HG, Wei YL, Zhang QG, Li BX, Liao ZB. Effects of *Gracilaria verrucosa*, *Enteromorpha prolifera*, algae residue and fungi residue on growth performance, and related biochemical indices of juvenile *Takifugu rubripes*. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(3): 141-150

江蓠、浒苔、藻渣和菌渣替代鱼粉对 红鳍东方鲀幼鱼生长性能、相关生化指标的影响*

郭 斌^{1,2} 梁萌青^① 徐后国¹ 卫育良¹
张庆功² 李本相² 廖章斌²



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

摘要 本实验旨在研究江蓠(*Gracilaria verrucosa*)、浒苔(*Enteromorpha prolifera*)、藻渣和菌渣替代鱼粉对红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)幼鱼生长性能、血清和肝脏生化指标和体组成的影响。实验共制成 6 种等氮、等脂的饲料,以含鱼粉 60%为对照组 1 和 45%鱼粉的为对照组 2,分别将 10%的江蓠、浒苔、藻渣、菌渣与植物蛋白质配合后替代对照组 1 饲料中 30%的鱼粉,投喂初始体重为(17.33±0.55) g 的红鳍东方鲀幼鱼 56 d。结果显示,1)浒苔组特定生长率(SGR)显著高于其他 5 组($P<0.05$),藻渣组 SGR 显著高于对照组 2 和江蓠组($P<0.05$),与对照组 1 和菌渣组无显著差异($P>0.05$);对照组 1 和浒苔组饲料效率(FER)显著高于对照组 2 和菌渣($P<0.05$),与江蓠和藻渣组无显著差异($P>0.05$);对照组 1 的蛋白质沉积率(PPV)和蛋白质效率(PER)显著高于对照组 2 和菌渣组($P<0.05$),与江蓠、浒苔和藻渣组无显著差异($P>0.05$)。2)各组血清和肝脏中谷丙转氨酶(GPT)和谷草转氨酶(GOT)活性均无显著差异($P>0.05$)。各组血清丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性均无显著差异($P>0.05$)。3)菌渣组鱼体粗蛋白质含量显著高于藻渣组($P<0.05$),与对照组 1、对照组 2、江蓠和浒苔无显著差异($P>0.05$);浒苔和藻渣组鱼体粗脂肪含量显著高于对照组 2 ($P<0.05$),与对照组 1、江蓠和菌渣组无显著差异($P>0.05$)。综合来看,将 10%江蓠、浒苔、藻渣和菌渣与植物蛋白质配合后替代饲料中 30%的鱼粉对红鳍东方鲀幼鱼的生长性能无不良影响,并且浒苔可以显著提高红鳍东方鲀的生长性能。

关键词 红鳍东方鲀; 海藻; 生长性能; 生化指标

中图分类号 S963 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2019)03-0141-10

植物蛋白质具有来源广、产量稳定、价格低廉等优点,一直作为替代鱼粉的蛋白质来源,但由于植物蛋白质含有抗营养因子(赵晓丹, 2015),并缺乏鱼类

所需的一些必需氨基酸和促生长成分,并不能完全替代鱼粉。海藻是海洋中的一类自养植物,与陆生植物相比,海藻含有丰富的矿物质、维生素、海藻多糖、

* 现代农业产业技术体系专项资金(CARS-47-15G)资助 [This work was supported by China Agriculture Research System (CARS-47-15G)]. 郭 斌, E-mail: 1219615337@qq.com

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

收稿日期: 2018-04-20, 收修改稿日期: 2018-05-25

不饱和脂肪酸、游离氨基酸以及具有诱食作用的一些物质,可以补充陆生植物蛋白质大量替代鱼粉所造成的营养缺乏(常巧玲等, 2006; 李人光等, 2009)。

红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)是目前主要的东方鲀养殖种类之一,其鱼肉鲜美,营养丰富,具有高蛋白、低脂肪的特点,有极高的经济价值。红鳍东方鲀对蛋白质的需求量较高,有研究表明,红鳍东方鲀对饲料中蛋白质的需求在40%~50% (Kim *et al.*, 2009; 王淑敏, 2008)。目前红鳍东方鲀的人工养殖技术已经比较成熟,但对红鳍东方鲀营养需求和配合饲料的研究滞后,研发高效低成本的专用配合饲料成为东方鲀产业发展的关键。本研究以常见的2种低值海藻[江蓠(*Gracilaria verrucosa*)、浒苔(*Enteromorpha prolifera*)]和2种工业下脚料(海带提取褐藻胶后的藻渣、土曲霉发酵生产衣康酸后的菌渣)与植物蛋白质配合成混合植物蛋白质替代红鳍东方鲀幼鱼饲料中部分鱼粉,探究其对红鳍东方鲀幼鱼生长性能、血清和肝脏生化指标和体组成的影响,以期海藻及工业下脚料在红鳍东方鲀饲料中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

实验共配制6种等氮、等脂的实验饲料,以含鱼粉60%为对照组1和含45%鱼粉为对照组2,分别以10%的江蓠、浒苔、藻渣(海带提取褐藻胶后的废渣)、菌渣(土曲霉发酵生产衣康酸后的废渣)与植物蛋白质配合后替代鱼粉对照组1中30%的鱼粉。所有原料粉碎后过80目筛网,按配方称量,逐级混匀,然后加鱼油混匀,加30%水搅拌均匀,用制粒机制成直径为2 mm的颗粒饲料,55℃鼓风干燥12 h后置于-20℃冷库保存。江蓠、浒苔、藻渣和菌渣的常规营养成分见表1,实验饲料组成及营养水平见表2,实验饲料氨基酸组成见表3。

表1 江蓠、浒苔、藻渣和菌渣的常规营养成分
(干物质基础, %)

Tab.1 Proximate nutritional components of *G. verrucosa*, *E. prolifera*, algae residue and fungi residue (DM basis, %)

项目 Items	江蓠 <i>G.verrucosa</i>	浒苔 <i>E. prolifera</i>	藻渣 Algae residue	菌渣 Fungi residue
粗蛋白质 Crude protein	18.25	8.47	17.30	23.10
粗脂肪 Crude lipid	0.49	0.76	0.50	0.33
粗灰分 Ash	25.42	27.65	23.13	24.81

1.2 饲养管理

养殖实验在山东省烟台市天源水产有限公司进行,实验所用红鳍东方鲀幼鱼购自山东省海阳市黄海水产有限公司。实验开始前先使用对照组饲料暂养7 d,使其适应养殖环境和饲料的大小、硬度。实验采用自然光照,养殖模式为流水养殖,水源为自然海水,水温为14~25℃,溶氧浓度为5.5 mg/L左右,盐度为35左右,pH为7.5~8.0。

实验开始前停食24 h,然后随机选取健康、规格一致的红鳍东方鲀幼鱼,初始体重为(17.33±0.55) g,随机分配到18个容积为150L的塑料养殖桶中,每个桶中投放25尾。将18个养殖桶随机分为6组,每组3个养殖桶,每组随机投喂1种实验饲料。养殖实验期间每天早、中、晚各表现饱食投喂1次,投喂0.5 h后对每个桶内的残饵计数,根据每100粒饲料的平均质量,计算残饵质量。养殖28 d后养殖桶换为500 L大桶,换桶没有造成鱼死亡。实验时间为2017年8月~2017年10月,养殖周期共56 d。

1.3 样品采集与分析

实验开始前随机取20尾红鳍东方鲀幼鱼作为初始鱼,用于常规营养成分分析。实验结束后,饥饿24 h,对每桶鱼进行计数、称重。每桶随机取3尾鱼,尾静脉取血,用1%肝素钠抗凝,4℃静置4 h后3500 r/min离心10 min,取上层血清,置于液氮中保存;采血后的鱼称重并测量体长,解剖分离内脏团和肝脏并称量,计算肥满度、肝体比和脏体比,取肝脏置于液氮中保存。每桶另随机取3尾鱼用于体成分分析。

饲料和鱼体常规营养成分分析参考AOAC(1995)的方法。其中,水分含量测定采用105℃烘干至恒重法,粗蛋白质含量测定采用凯氏定氮法(VELP凯氏定氮仪,UDK-142 Automatic Distillation Unit,意大利),粗脂肪含量测定采用索氏抽提法,以石油醚作为抽提液(SOXTEC2050 FOSS脂肪测定仪,瑞典),粗灰分含量采用马弗炉(550℃)灼烧6 h测得。

肝脏中酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、谷草转氨酶(GOT)、谷丙转氨酶(GPT)、溶菌酶(LZM)活性以及血清中超氧化物歧化酶(SOD)、ACP、AKP、GOT、GPT、LZM活性和丙二醛(MDA)含量均采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒进行测定。

饲料中氨基酸组成的测定参考GB/T 18246-2000的方法,使用L-8900全自动氨基酸分析仪(Hitachi,

表2 实验饲料配方及营养组成(干物质基础, %)
Tab.2 Formula and nutrient composition of experimental diets (DM basis, %)

项目 Items	组别 Groups					
	对照组 1 Control 1	对照组 2 Control 2	江蓠 <i>G. verrucosa</i>	浒苔 <i>E. prolifera</i>	藻渣 Algae residue	菌渣 Fungi residue
原料 Ingredients						
鱼粉 Fish meal	60.00	45.00	30.00	30.00	30.00	30.00
江蓠 <i>G. verrucosa</i>			10.00			
浒苔 <i>E. prolifera</i>				10.00		
藻渣 Algae residue					10.00	
菌渣 Fungi residue						10.00
谷朊粉 Wheat gluten	1.00	9.00	16.00	16.00	15.00	15.00
玉米蛋白粉 Corn gluten meal	2.00	5.00	9.00	9.00	9.00	9.00
豆粕 Soybean meal	2.00	8.00	15.00	15.00	15.00	15.00
小麦粉 Wheat meal	26.30	23.30	9.30	9.30	10.30	10.30
磷脂 Phospholipid	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
胆碱 Choline	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
鱼油 Fish oil	4.00	5.00	6.00	6.00	6.00	6.00
磷酸二氢钙 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
维生素预混料 Vitamin premix ¹	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
矿物质预混料 Mineral premix ²	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
维生素 C Vitamin C	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
合计 Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
营养组成 Nutrient composition						
粗蛋白 Crude protein	51.04	50.72	51.38	51.54	51.67	52.32
粗脂肪 Crude lipid	9.92	9.66	10.28	10.05	9.46	9.51
灰分 Ash	10.40	12.70	13.77	10.35	10.59	11.31

1. 维生素混合物(mg/g 混合物): 硫胺素, 2.5 mg; 核黄素, 4.5 mg; 盐酸吡哆醇, 2 mg; 维生素 B₁₂, 0.01 mg; 维生素 K₃, 1 mg; 肌醇, 80 mg; 泛酸, 6 mg; 烟酸, 20 mg; 叶酸, 2 mg; 生物素, 0.12 mg; 维生素 A, 3.2 mg; 维生素 D, 0.5 mg; 维生素 E, 12 mg; 次粉 867 mg; 2. 矿物质混合物(mg/g 混合物): 氟化钠, 0.2 mg; 碘化钾, 0.08 mg; 氯化钴, 5 mg; 硫酸铜, 1 mg; 硫酸铁, 8 mg; 硫酸锌, 5 mg; 硫酸镁, 120 mg; 磷酸二氢钙, 300 mg; 氯化钠, 10 mg; 沸石粉, 551 mg

1. Vitamin premix (mg/g premix): thiamine 2.5 mg, riboflavin 4.5 mg, pyridoxine 2 mg, vitamin B₁₂ 0.01 mg, menadione 1 mg, inositol 80 mg, pantothenate 6 mg, tocopherol acetate 20 mg, folic acid 2 mg, biotin 0.12 mg, vitamin A 3.2 mg, vitamin D 0.5 mg, vitamin E 12 mg, wheat flour 867 mg; 2. Mineral premix (mg/g premix): NaF 0.2 mg; KI 0.08 mg; CoCl₂·6H₂O 5 mg; CuSO₄·5H₂O 1 mg; FeSO₄·7H₂O 8 mg; ZnSO₄·7H₂O 5 mg; MnSO₄·4H₂O 120 mg; Ca(H₂PO₄)₂·H₂O 300 mg; NaCl 10 mg; Mordenzo 551 mg

日本)测定。检测了饲料中9种必需氨基酸、8种非必需氨基酸和牛磺酸的含量,色氨酸因酸水解破坏而未检测。

1.4 计算公式

成活率(Survival rate, SR, %)=100×终末鱼尾数/初始鱼尾数;

摄食率(Feed intake, FI, %/d)=100×摄食饲料干重/[实验天数×(初始体重+终末体重)/2];

特定生长率(Special growth rate, SGR, %/d)=100×(ln 终末体重-ln 初始体重)/实验天数;

饲料效率(Feed efficiency ratio, FER)=(终末体重-

初始体重)/摄食饲料干重;

蛋白质沉积率(Protein productive value, PPV, %)=100×鱼体蛋白质沉积量/总饲料蛋白质摄入量;

蛋白质效率(Protein efficiency ratio, PER)=(终末体重-初始体重)/总饲料蛋白质摄入量;

肝体比(Hepatosomatic index, HIS, %)=100×肝脏重/体重;

脏体比(Viscerosomatic index, VSI, %)=100×内脏团重/体重;

肥满度(Condition factor, CF)=100×体重/体长³(体重单位: g; 体长单位: cm)。

表3 实验饲料氨基酸组成(干物质基础, %)
Tab.3 Amino acid composition of experimental diets (DM basis, %)

氨基酸 Amino acids	组别 Groups					
	对照组 1 Control 1	对照组 2 Control 2	江蓼 <i>G. verrucosa</i>	浒苔 <i>E. prolifera</i>	藻渣 Algae residue	菌渣 Fungi residue
必需氨基酸 EAA						
苏氨酸 Thr	1.91	1.75	1.73	1.42	1.52	1.53
缬氨酸 Val	2.13	2.06	1.99	1.98	1.98	1.96
蛋氨酸 Met	1.16	1.19	0.96	0.74	1.05	1.31
异亮氨酸 Ile	1.84	1.81	1.77	1.59	1.72	1.70
亮氨酸 Leu	3.43	3.51	3.75	3.44	3.55	3.49
苯丙氨酸 Phe	2.27	2.13	2.29	3.39	2.93	2.84
赖氨酸 Lys	3.19	2.64	2.28	2.34	2.15	2.15
组氨酸 His	1.14	1.26	1.12	1.02	1.02	1.03
精氨酸 Arg	2.44	2.20	2.19	1.99	1.96	1.98
总必需氨基酸 Σ EAA	19.52	18.55	18.08	17.91	17.88	18.00
非必需氨基酸 NEAA						
天冬氨酸 Asp	3.92	3.55	3.50	2.66	3.05	3.05
丝氨酸 Ser	1.85	1.91	2.10	1.76	1.84	1.86
谷氨酸 Glu	7.32	8.87	8.51	8.68	9.06	8.96
甘氨酸 Gly	2.26	2.08	1.99	1.94	1.92	2.00
丙氨酸 Ala	2.77	2.49	2.30	2.09	2.13	2.12
半胱氨酸 Cys	0.38	0.62	0.60	0.58	0.70	0.47
酪氨酸 Tyr	1.60	1.60	1.64	2.00	1.79	1.82
脯氨酸 Pro	5.73	7.00	8.33	6.80	7.13	7.19
牛磺酸 Tau	0.42	0.31	0.34	0.33	0.31	0.37
总非必需氨基酸 Σ NEAA	26.24	28.53	29.32	26.84	27.94	27.84
总必需氨基酸/ Σ EAA/ Σ NEAA	0.75	0.66	0.62	0.67	0.64	0.65
总非必需氨基酸						

1.5 数据统计分析

实验数据使用 SPSS 17.0 软件进行处理, 采用单因素方差分析(One-way ANOVA)程序进行方差分析, 若存在显著差异($P < 0.05$), 则采用 Duncan 氏法进行组间的多重比较。结果以平均值 \pm 标准误(Mean \pm SE)表示。

2 结果

2.1 江蓼、浒苔、藻渣和菌渣替代鱼粉对红鳍东方鲀幼鱼生长性能的影响

江蓼、浒苔、藻渣和菌渣替代鱼粉对红鳍东方鲀幼鱼生长性能的影响如表 4 所示。各组红鳍东方鲀幼鱼的存活率介于 80%~90%, 藻渣组显著高于对照组 2 ($P < 0.05$), 与对照组 1、江蓼、浒苔和菌渣组无显著差异($P > 0.05$); 浒苔组 SGR 最高, 显著高于含 60%

鱼粉的对照组 1、45%鱼粉的对照组 2、江蓼、藻渣和菌渣组($P < 0.05$), 藻渣组显著高于对照组 2 和江蓼组($P < 0.05$), 与对照组 1 组和菌渣组无显著差异($P > 0.05$); 对照组 2 和菌渣组饲料摄食率显著高于对照组 1 和江蓼组($P < 0.05$), 与浒苔和藻渣组无显著差异($P > 0.05$); 对照组 1、浒苔组饲料效率显著高于对照组 2 和菌渣组($P < 0.05$), 与江蓼和藻渣组无显著差异($P > 0.05$); 对照组 1 的蛋白质沉积率和蛋白质效率显著高于对照组 2 和菌渣组($P < 0.05$), 与江蓼、浒苔和藻渣组无显著差异($P > 0.05$)。

藻渣组肝体比显著高于对照组 1、对照组 2、江蓼和菌渣组($P < 0.05$), 与浒苔组无显著差异($P > 0.05$); 藻渣组脏体比显著高于对照组 2($P < 0.05$), 与对照组 1、江蓼、浒苔和菌渣组无显著差异($P > 0.05$); 各组的肥满度无显著差异($P > 0.05$)。

表4 江蓼、浒苔、藻渣和菌渣替代鱼粉对红鳍东方鲀幼鱼生长性能和形体指标的影响
Tab.4 Effects of fish meal replacement by *G. verrucosa*, *E. proliferata*, algae residue and fungi residue on the growth performance and physical parameters of juvenile tiger puffer

项目 Items	组别 Groups					
	对照组 1 Control 1	对照组 2 Control 2	江蓼 <i>G. verrucosa</i>	浒苔 <i>E. proliferata</i>	藻渣 Algae residue	菌渣 Fungi residue
存活率 SR(%)	85.33±3.53 ^{ab}	80.00±2.31 ^b	81.33±2.67 ^{ab}	85.33±3.53 ^{ab}	90.67±1.33 ^a	89.33±2.67 ^{ab}
特定生长率 SGR(%/d)	1.96±0.07 ^{bc}	1.88±0.07 ^c	1.91±0.03 ^c	2.20±0.02 ^a	2.08±0.01 ^b	1.98±0.05 ^{bc}
摄食率 FI(%/d)	1.89±0.06 ^c	2.14±0.02 ^a	1.95±0.07 ^{bc}	2.08±0.03 ^{ab}	2.07±0.03 ^{ab}	2.14±0.05 ^a
饲料效率 FER	0.93±0.01 ^a	0.80±0.03 ^c	0.88±0.04 ^{abc}	0.93±0.01 ^a	0.89±0.02 ^{ab}	0.83±0.03 ^{bc}
蛋白质沉积率 PPV(%)	28.04±0.20 ^a	24.69±0.87 ^b	26.33±1.32 ^{ab}	26.96±0.30 ^{ab}	25.34±0.40 ^{ab}	24.89±1.47 ^b
蛋白质效率 PER	1.85±0.02 ^a	1.64±0.06 ^{bc}	1.72±0.09 ^{abc}	1.80±0.02 ^{ab}	1.73±0.03 ^{abc}	1.59±0.07 ^c
肝体比 HSI(%)	9.30±0.41 ^b	9.15±0.52 ^b	9.32±0.58 ^b	10.26±0.54 ^{ab}	11.19±0.55 ^a	9.51±0.56 ^b
脏体比 VSI(%)	18.65±0.65 ^{ab}	17.73±0.72 ^b	18.98±0.46 ^{ab}	19.51±0.57 ^{ab}	20.25±0.66 ^a	19.23±0.54 ^{ab}
肥满度 CF	3.71±0.13	3.65±0.12	3.55±0.11	3.82±0.10	3.84±0.08	3.76±0.25

注: 同行数据肩标无字母或相同字母表示差异不显著($P>0.05$), 不同字母表示差异显著($P<0.05$), 下同

Note: In the same row, values with no letter or the same superscripts mean no significant difference ($P>0.05$), while with different superscripts mean significant difference ($P<0.05$), the same as below

2.2 江蓼、浒苔、藻渣和菌渣替代鱼粉对红鳍东方鲀幼鱼血清和肝脏生化指标的影响

江蓼、浒苔、藻渣和菌渣替代鱼粉对红鳍东方鲀血清和肝脏中 GPT 和 GOT 活性的影响如表 5 所示。各组血清和肝脏中 GPT 和 GOT 活性均无显著差异($P>0.05$)。

江蓼、浒苔、藻渣和菌渣替代鱼粉对红鳍东方鲀幼鱼血清和肝脏非特异性免疫和抗氧化指标的影响如表 6 所示。对照组 1 血清 ACP 活性显著高于对照组 2 和浒苔组($P<0.05$), 与江蓼、藻渣和菌渣组无显著差异($P>0.05$); 江蓼和藻渣组血清 AKP 活性显著高于对照组 1、对照组 2 和菌渣组($P<0.05$), 与浒苔组无显著差异($P>0.05$); 浒苔组血清溶菌酶活性显著高

于江蓼组($P<0.05$), 与对照组 1、对照组 2、藻渣和菌渣组无显著差异($P>0.05$); 各组血清中 MDA 含量和 SOD 活性均无显著差异($P>0.05$)。

各组肝脏 ACP 活性无显著差异($P>0.05$); 对照组 2 和菌渣组肝脏 AKP 活性显著高于对照组 1 ($P<0.05$), 与江蓼、浒苔和藻渣组无显著差异($P>0.05$); 对照组 2 和江蓼组肝脏溶菌酶活性显著高于对照组 1、藻渣和菌渣组($P<0.05$), 与浒苔组无显著差异($P>0.05$)。

2.3 江蓼、浒苔、藻渣和菌渣替代鱼粉对红鳍东方鲀幼鱼体组成的影响

江蓼、浒苔、藻渣和菌渣替代鱼粉对红鳍东方鲀幼鱼体组成的影响如表 7 所示。各组鱼体的水分含量

表5 江蓼、浒苔、藻渣和菌渣替代鱼粉对红鳍东方鲀幼鱼血清和肝脏中 GPT 和 GOT 活性的影响
Tab.5 Effects of fish meal replacement by *G. verrucosa*, *E. proliferata*, algae residue and fungi residue on GPT and GOT activities in serum and liver of juvenile tiger puffer

项目 Items	组别 Groups					
	对照组 1 Control 1	对照组 2 Control 2	江蓼 <i>G. verrucosa</i>	浒苔 <i>E. proliferata</i>	藻渣 Algae residue	菌渣 Fungi residue
血清 Serum						
谷丙转氨酶 GPT(U/L)	26.75±4.26	21.16±5.96	24.97±4.29	19.95±4.04	25.62±5.95	31.56±0.54
谷草转氨酶 GOT(U/L)	13.57±2.09	11.83±3.37	12.62±2.02	12.58±3.40	11.42±2.59	19.09±1.24
肝脏 Liver						
谷丙转氨酶 GPT(U/g prot)	48.15±1.36	51.02±5.24	40.08±3.53	42.82±2.01	45.23±4.41	43.28±5.23
谷草转氨酶 GOT(U/g prot)	48.45±3.48	47.22±1.55	48.24±4.22	47.10±3.93	46.57±0.95	41.57±1.43

表 6 江蓼、浒苔、藻渣和菌渣替代鱼粉对红鳍东方鲀幼鱼血清和肝脏非特异性免疫和抗氧化指标的影响
Tab.6 Effects of fish meal replacement by *G. verrucosa*, *E. prolifera*, algae residue and fungi residue on the serum and liver non-specific immune and antioxidant indices of juvenile tiger puffer

项目 Items	组别 Groups					
	对照组 1 Control 1	对照组 2 Control 2	江蓼 <i>G. verrucosa</i>	浒苔 <i>E. prolifera</i>	藻渣 Algae residue	菌渣 Fungi residue
血清 Serum						
酸性磷酸酶 ACP(金氏单位/dl)	4.40±0.28 ^a	3.44±0.25 ^b	3.99±0.27 ^{ab}	3.44±0.14 ^b	3.93±0.40 ^{ab}	3.89±0.13 ^{ab}
碱性磷酸酶 AKP(金氏单位/dl)	2.91±0.16 ^{bc}	2.47±0.11 ^c	3.69±0.17 ^a	3.22±0.08 ^{ab}	3.44±0.24 ^a	2.86±0.06 ^{bc}
溶菌酶 (U/ml)	411.20±11.27 ^{ab}	408.59±5.76 ^{ab}	385.42±10.29 ^b	430.73±11.64 ^a	424.48±6.89 ^{ab}	414.32±21.83 ^{ab}
丙二醛 MDA(nmol/ml)	9.87±0.54	9.49±0.55	9.19±0.45	9.33±0.88	10.35±0.83	8.27±0.36
超氧化物歧化酶 SOD(U/ml)	241.15±5.80	247.49±16.79	253.88±18.34	256.95±18.28	257.59±5.47	269.90±3.00
肝脏 Liver						
酸性磷酸酶 ACP(金氏单位/g prot)	142.95±12.34	150.16±5.01	144.74±6.70	135.10±5.30	138.35±9.29	159.17±5.41
碱性磷酸酶 AKP(金氏单位/g prot)	9.45±1.06 ^b	14.78±2.21 ^a	14.15±1.04 ^{ab}	12.06±1.67 ^{ab}	11.86±1.03 ^{ab}	16.74±1.41 ^a
溶菌酶 LZM(U/mg prot)	74.54±6.80 ^{bc}	105.82±9.34 ^a	113.49±1.60 ^a	97.32±5.77 ^{ab}	55.87±10.78 ^c	61.95±16.64 ^c

表 7 江蓼、浒苔、藻渣和菌渣替代鱼粉对红鳍东方鲀幼鱼体组成的影响(湿重基础, %)
Tab.7 Effects of fish meal replacement by *G. verrucosa*, *E. prolifera*, algae residue and fungi residue on the body composition of juvenile tiger puffer (Wet weight basis, %)

项目 Items	组别 Groups					
	对照组 1 Control 1	对照组 2 Control 2	江蓼 <i>G. verrucosa</i>	浒苔 <i>E. prolifera</i>	藻渣 Algae residue	菌渣 Fungi residue
水分 Moisture	77.54±0.33	77.89±0.30	77.36±0.28	76.94±0.47	77.64±0.39	77.21±0.42
粗蛋白质 Crude protein	14.80±0.16 ^{ab}	14.70±0.02 ^{ab}	14.84±0.14 ^{ab}	14.73±0.14 ^{ab}	14.49±0.03 ^b	15.10±0.19 ^a
粗脂肪 Crude lipid	4.33±0.22 ^{ab}	3.88±0.05 ^b	4.68±0.22 ^{ab}	4.94±0.32 ^a	5.01±0.35 ^a	4.32±0.21 ^{ab}
粗灰分 Ash	2.46±0.03 ^{ab}	2.49±0.05 ^{ab}	2.53±0.01 ^a	2.40±0.01 ^b	2.14±0.04 ^c	2.39±0.04 ^b

均无显著差异($P>0.05$); 菌渣组鱼体粗蛋白质含量显著高于藻渣组($P<0.05$), 与对照组 1、对照组 2、江蓼和浒苔无显著差异($P>0.05$); 浒苔和藻渣组鱼体粗脂肪含量显著高于对照组 2($P<0.05$), 与对照组 1、江蓼和菌渣组无显著差异($P>0.05$); 浒苔和菌渣组鱼体灰分含量显著低于江蓼组($P<0.05$), 显著高于藻渣组($P<0.05$), 与对照组 1 和对照组 2 无显著差异($P>0.05$)。

3 讨论

在以往的植物蛋白替代鱼粉的研究中, 肉食性鱼类饲料中植物蛋白替代鱼粉的比例较低。大菱鲆(*Scophthalmus maxima*)饲料中植物蛋白可以替代 17%~21% 的鱼粉而不影响其生长性能和饲料效率

(Day *et al.*, 2000; 陈超等, 2012); 豆粕可以替代饲料中 16% 的鱼粉而不影响花鲈(*Lateolabrax japonicus*)生长(王国霞等, 2014); 菜籽粕可以替代饲料中 13.5% 的鱼粉而不影响虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的生长性能和饲料利用(崔存河等, 2016)。在对红鳍东方鲀的研究中发现, 豆粕可以替代饲料中 13% 左右的鱼粉而不影响红鳍东方鲀生长(Kikuchi *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2011)。在本研究中, 江蓼、浒苔、藻渣和菌渣组鱼粉含量为 30%, 但生长性能均优于含 45% 鱼粉的对照组 2, 并且浒苔组生长显著高于含 60% 鱼粉的对照组 1, 表明以江蓼、浒苔、藻渣和菌渣配合植物蛋白替代鱼粉能够促进红鳍东方鲀生长。这与目前已报道的在饲料中添加海藻可以促进眼斑拟石首鱼(*Sciaenops ocellatus*)、大菱鲆、大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)、

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)等生长的研究结果相似(李雅婷等, 2016; 卢青等, 2015; Asino, 2010; 彭素晓等, 2017)。

海藻对水产动物生长性能的促进, 一方面可能是由于海藻中含有的一些具有诱食作用的物质(如 DMSP 等)增加了摄食量(邹仕庚等, 2005; 王亮, 2012), 促进了生长。本研究中, 江蓼、浒苔、藻渣和菌渣组摄食率均高于对照组 1, 说明江蓼、浒苔、藻渣和菌渣对红鳍东方鲀均能起到一定诱食作用。另一方面, 海藻中含有的牛磺酸可能补充了陆生植物蛋白替代鱼粉后的牛磺酸缺乏。本研究中, 江蓼、浒苔、藻渣和菌渣组饲料中鱼粉含量为 30%, 牛磺酸含量却均不低于含 45% 鱼粉的对照组 2, 说明江蓼、浒苔、藻渣和菌渣补充了一定的牛磺酸, 这可能也是江蓼、浒苔、藻渣和菌渣组生长性能并未降低的原因之一。江蓼、浒苔、藻渣和菌渣组饲料必需氨基酸中苏氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、组氨酸和精氨酸的含量均低于对照组 1 和对照组 2, 苯丙氨酸含量均高于对照组 1 和对照组 2, 而江蓼、浒苔和藻渣组生长均优于对照组 2, 这提示江蓼、浒苔和藻渣组中的苏氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、组氨酸和精氨酸含量可能基本满足了红鳍东方鲀生长, 而浒苔组生长最好, 可能与浒苔组饲料中最高苯丙氨酸含量有关(表 3), 具体红鳍东方鲀对必需氨基酸的需求量有待进一步研究。江蓼、浒苔和藻渣中的海藻多糖对红鳍东方鲀生长也可能具有促进作用, 有研究报道了饲料中添加海藻多糖可以促进珍珠龙胆石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂)(林建斌等, 2017)、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)(杨晴等, 2014)、鲫鱼(*Carassius auratus*)(耿中雷等, 2017)的生长, 由于本研究并未对海藻中的多糖进行测定, 因此具体原因还需要进一步研究。而菌渣对红鳍东方鲀生长的促进可能也与真菌菌体中的多糖有关, 真菌细胞中含有壳聚糖等多糖。有研究表明, 饲料中添加壳聚糖可以促进星斑川鲈(*Platichthys stellatus*)幼鱼(王际英等, 2013)、俄罗斯鲟(*Acipenser gueldenstaedti*)(肖艳翼等, 2017)生长。

作者之前对江蓼、浒苔、藻渣和菌渣替代大菱鲆饲料中鱼粉的研究中, 江蓼、藻渣和菌渣可以替代含 60% 鱼粉的对照组中 35% 的鱼粉而不影响大菱鲆生长, 而浒苔组则显著降低了大菱鲆生长(郭斌等, 2018)。浒苔组实验结果与本研究中红鳍东方鲀的实验结果不同, 可能与红鳍东方鲀和大菱鲆之间营养需求和消化道组织结构不同等有关。大菱鲆消化道存在胃、前肠、中肠和后肠的分化, 胃黏膜有许多褶皱,

有发达的胃腺(崔龙波等, 2008); 红鳍东方鲀消化道仅有胃与小肠的分化, 小肠前、中、后部区分不明显, 胃不含胃腺, 仅有分泌细胞(丛娇日等, 1998), 并且有研究发现红鳍东方鲀胃中蛋白酶在酸性条件下活性极低, 而在 pH=6 时有峰值(万蓁蓁, 2005)。红鳍东方鲀生活习性也与大菱鲆不同, 红鳍东方鲀适宜水温更高, 红鳍东方鲀最适水温为 28℃(张云等, 2010), 而大菱鲆最适水温为 18℃(李文龙等, 2017), 红鳍东方鲀游动摄食更频繁, 消化速度更快, 食物在肠道停留时间更短。红鳍东方鲀这些生理上的特点可能与其摄食率高、饲料效率低存在联系, 而本实验浒苔组生长较好的具体原因还需要进一步研究。

GPT 和 GOT 是鱼类氨基酸代谢中的 2 个关键酶, 它们在肝脏中活性的高低反映了氨基酸代谢程度的强弱和肝脏功能的正常与否(严俊丽等, 2016)。本研究中, 江蓼、浒苔、藻渣和菌渣组红鳍东方鲀肝脏 GPT 和 GOT 活性均低于对照组 1, 但并无显著差异, 说明江蓼、浒苔、藻渣和菌渣替代鱼粉后虽然改变了饲料中氨基酸的组成, 降低了饲料必需氨基酸含量, 但并没有显著影响红鳍东方鲀对氨基酸的代谢。正常情况下血清中 GPT 和 GOT 含量很少, 当肝脏组织受损时, 细胞膜通透性发生改变, GPT 和 GOT 会进入血液, 导致血清中 GPT 和 GOT 活性上升(严俊丽等, 2016)。本研究中, 江蓼、浒苔和藻渣组血清 GPT 和 GOT 均低于对照组 1, 说明江蓼、浒苔、藻渣替代鱼粉对红鳍东方鲀幼鱼的肝脏没有造成不良影响。MDA 是多不饱和脂肪酸被超氧阴离子自由基过氧化而产生的脂质过氧化物, 具有细胞毒性, 在生物体内可引起细胞代谢及功能障碍, 血清中 MDA 的含量间接反映组织细胞的氧化损伤程度(周胜强等, 2013; Jain *et al*, 2001)。SOD 对机体氧化与抗氧化平衡起着重要作用, 能清除超氧阴离子自由基, 保护细胞免受损伤。本研究中, 江蓼、浒苔、藻渣和菌渣组血清 MDA 含量和 SOD 活性与对照组 1 和对照组 2 均无显著差异, 说明江蓼、浒苔、藻渣和菌渣替代鱼粉对红鳍东方鲀鱼体的抗氧化能力没有造成不良影响。

溶菌酶是无脊椎动物非特异性免疫的重要组成部分之一, 能通过水解革兰氏阳性菌细胞壁中的肽聚糖而使之细胞裂解, 从而杀灭病原微生物(何瑞鹏等, 2017)。本研究中, 浒苔、藻渣、菌渣组红鳍东方鲀血清溶菌酶活性高于对照组 1 和对照组 2, 江蓼和浒苔组肝脏溶菌酶活性高于对照组 1, 说明江蓼、浒苔、藻渣和菌渣对提高红鳍东方鲀非特异性免疫力具有一定作用, 而对照组 1、藻渣和菌渣组肝脏溶菌酶活性显著低于对照组 2 的原因尚不明确, 还需要进一步研究。

4 结 论

将 10% 的江蓠、浒苔、藻渣和菌渣与植物蛋白质配合替代饲料中 30% 的鱼粉对红鳍东方鲀幼鱼的生长性能无不良影响, 并且浒苔可以显著提高红鳍东方鲀幼鱼的生长性能。

参 考 文 献

- Asino HM. Evaluation of *Enteromorpha prolifera* as a feed component in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) diets. Master's Thesis of Ocean University of China, 2010, 1–35 [Hiskia Megameno Asino. 饲料中添加浒苔 *Enteromorpha prolifera* 对大黄鱼生长性能的影响. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2010, 1–35]
- Chang QL, Sun JY. Algae feed resources and its application in aquaculture. *Feed Industry*, 2006, 27(2): 62–64 [常巧玲, 孙建义. 海藻饲料资源及其在水产养殖中的应用研究. 饲料工业, 2006, 27(2): 62–64]
- Chen C, Chen JH. Effects of taurine and compound crystalline amino acid on feed intake, growth and feed utilization of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(23): 108–112 [陈超, 陈京华. 牛磺酸、晶体氨基酸对大菱鲆摄食、生长和饲料利用率的影响. 中国农学通报, 2012, 28(23): 108–112]
- Cong JR, Zhang ZH, Yao SC. A study of the histology and morphology of the digestive tract of the juvenile globefish, *Fugu rubripes*. *Marine Sciences*, 1998, 22(4): 53–58 [丛娇日, 张朝晖, 姚善成. 红鳍东方鲀幼鱼消化道的组织学和形态学研究. 海洋科学, 1998, 22(4): 53–58]
- Cui CH, Yang CH, Bu XY, et al. Effect replacing fish meal with rapeseed meal on growth, body composition and serum biochemical parameter of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Feed Industry*, 2016, 37(22): 21–25 [崔存河, 杨成辉, 卜宪勇, 等. 菜粕替代鱼粉对虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 生长、体组成和血液学指标的影响. 饲料工业, 2016, 37(22): 21–25]
- Cui LB, Zhou XY, Lü H, et al. Histological and histochemical study on the digestive system of *Scophthalmus maximus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2008, 29(6): 47–51 [崔龙波, 周雪莹, 吕虹, 等. 大菱鲆消化系统的组织学和组织化学研究. 渔业科学进展, 2008, 29(6): 47–51]
- Day OJ, González HGP. Soybean protein concentrate as a protein source for turbot *Scophthalmus maximus* L. *Aquaculture Nutrition*, 2000, 6(4): 221–228
- Geng ZL, Yang YY, Cai CR, et al. Effect of dietary supplementation of four alga polysaccharides on growth and disease resistance in crucian carp *Carassius auratus*. *Fisheries Science*, 2017, 36(6): 753–757 [耿中雷, 杨亚云, 蔡春尔, 等. 4 种海藻多糖对鲫鱼生长免疫影响的探究. 水产科学, 2017, 36(6): 753–757]
- Guo B, Liang MQ, Xu HG, et al. Effects of *Gracilaria verrucosa*, *Enteromorpha prolifera*, algae residue and fungi residue on growth performance, serum and liver biochemical indices, body composition and intestinal histological morphology of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2018, 30(1): 299–312 [郭斌, 梁萌青, 徐后国, 等. 江蓠、浒苔、藻渣和菌渣替代鱼粉对大菱鲆幼鱼生长性能、血清和肝脏生化指标、体组成和肠道组织结构的影响. 动物营养学报, 2018, 30(1): 299–312]
- He RP, Feng J, Tian XL, et al. Effect of dietary supplementation of *Clostridium butyricum* on the growth and activities of digestive and serum antioxidant enzymes and lysozyme of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂). *Periodical of Ocean University of China*, 2017, 47(11): 15–23 [何瑞鹏, 奉杰, 田相利, 等. 酪酸菌对珍珠龙胆石斑鱼生长、消化酶、血清抗氧化酶和溶菌酶活性的影响. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2017, 47(11): 15–23]
- Jain SK, Lim G. Pyridoxine and pyridoxamine inhibits superoxide radicals and prevents lipid peroxidation, protein glycosylation, and (Na⁺ + K⁺)-ATPase activity reduction in high glucose-treated human erythrocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, 2001, 30(3): 232–237
- Kikuchi K, Furuta T. Use of defatted soybean meal and blue mussel meat as substitute for fish meal in the diet of tiger puffer, *Takifugu rubripes*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2009, 40(4): 472–482
- Li RG, Jiang YX, Jiang RY, et al. The comprehensive utilization technology of large seaweed as feed. *Scientific Fish Farming*, 2009(10): 64–65 [李人光, 姜永新, 姜瑞勇, 等. 大型海藻作为饲料的综合利用技术. 科学养鱼, 2009(10): 64–65]
- Li WL, Liang XM, Liang MQ, et al. Effect of temperature on growth and enzyme activity related to immunity in juvenile turbot *Scophthalmus maximus*. *Fisheries Science*, 2017, 36(3): 311–316 [李文龙, 梁兴明, 梁萌青, 等. 温度对大菱鲆幼鱼生长及免疫相关酶活性的影响. 水产科学, 2017, 36(3): 311–316]
- Li YT, Chen M, Zeng SL, et al. Effect of dietary *Gracilaria lemaneiformis* on growth performance, fatty acid composition, immunity and intestinal histology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *South China Fisheries Science*, 2016, 12(1): 85–93 [李雅婷, 陈明, 曾帅霖, 等. 饲料中添加龙须菜对眼斑拟石首鱼生长、脂肪酸组成、免疫及肠道的影响. 南方水产科学, 2016, 12(1): 85–93]
- Lin JB, Liang P, Zhu QG, et al. Effect of laminarin on growth and immunity of pearl gentian grouper. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2017, 32(1): 17–21 [林建斌, 梁萍, 朱庆国, 等. 海带多糖对珍珠龙胆石斑鱼生长性能和免疫力的影响. 福建农业学报, 2017, 32(1): 17–21]
- Lu Q, Yang N, Wang ZL, et al. The effects of dietary *Enteromorpha prolifera* on the growth and non-specific

- immunity of juvenile turbot(*Scophthalmus maximus*). Journal of Qingdao Agricultural University(Natural Science), 2015, 32(1): 62–66 [卢青, 杨宁, 王正丽, 等. 饲料中添加浒苔对大菱鲆生长和非特异性免疫力的影响. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2015, 32(1): 62–66]
- Peng SX, Chang ZQ, Ma L, *et al.* Effects of kelp meal adding proportion and its enzymatic hydrolysates on growth, digestion and non-specific immunity of *Litopenaeus vannamei*. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2017, 29(7): 2587–2596 [彭素晓, 常志强, 马骊, 等. 海带渣添加比例及其酶解产物对凡纳滨对虾生长、消化和非特异性免疫力的影响. 动物营养学报, 2017, 29(7): 2587–2596]
- Kim SS, Lee KJ. Dietary protein requirement of juvenile tiger puffer (*Takifugu rubripes*). Aquaculture, 2009, 287(1–2): 219–222
- Lim SJ, Kim SS, Ko GY, *et al.* Fish meal replacement by soybean meal in diets for tiger puffer, *Takifugu rubripes*. Aquaculture, 2011, 313(1): 165–170
- Wan ZZ. The development of the morphology and the physiology of digestion indigestion of *Takifugu rubripes*. Master's Thesis of Ocean University of China, 2005, 1–81 [万蓁蓁. 红鳍东方鲀幼体发育和消化生理的研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2005, 1–81]
- Wang GX, Fu JJ, Huang YH, *et al.* Effect of partial replacement of fish meal by five plant proteins on growth performance and digestive enzymes activities of *Lateolabrax japonicus*. Hubei Agricultural Sciences, 2014, 53(4): 866–870 [王国霞, 付晶晶, 黄燕华, 等. 5种植物蛋白源替代鱼粉对花鲈生长性能和消化酶活性的影响. 湖北农业科学, 2014, 53(4): 866–870]
- Wang JY, Jiang JK, Zhang LM, *et al.* Effects of dietary chitosan on growth, lipid deposition and antioxidant capacity of juvenile starry flounder (*Platichthys stellatus*). Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29(8): 64–70 [王际英, 蒋锦坤, 张利民, 等. 壳聚糖对星斑川鲷幼鱼生长、脂肪含量及抗氧化能力的影响. 中国农学通报, 2013, 29(8): 64–70]
- Wang L. The detection of DMSP concentration in some common seaweeds. Master's Thesis of Soochow University, 2012, 1–47 [王亮. 部分大型海藻 DMSP 含量的检测. 苏州大学硕士研究生学位论文, 2012, 1–47]
- Wang SM. Study on the optimum dietary protein level of juvenile tiger puffer, *Fugu rubripes*. Master's Thesis of Hebei Normal University, 2008, 1–55 [王淑敏. 红鳍东方鲀幼鱼饲料最适蛋白质含量的研究. 河北师范大学硕士研究生学位论文, 2008, 1–55]
- Xiao YY, Xia YT, Liu TF, *et al.* Effects of chitosan on growth performance and immunity of juvenile Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti*). Acta Hydrobiologica Sinica, 2017, 41(1): 114–120 [肖艳翼, 夏永涛, 刘腾飞, 等. 壳聚糖对俄罗斯鲟幼鱼生长性能及免疫功能的影响. 水生生物学报, 2017, 41(1): 114–120]
- Yan JL, Chen SQ, Chang Q, *et al.* Effects of antarctic krill meal replacing fish meal on growth performance, serum and liver biochemical indices and serum non-specific immune indices of juvenile spotted halibut (*Verasper variegatus*). Chinese Journal of Animal Nutrition, 2016, 28(11): 3503–3510 [严俊丽, 陈四清, 常青, 等. 南极磷虾粉替代鱼粉对圆斑星鲽幼鱼生长性能、血清和肝脏生化指标及血清非特异性免疫指标的影响. 动物营养学报, 2016, 28(11): 3503–3510]
- Yang Q, Yang R, Zhou QC, *et al.* Effects of fucoidan on growth performance and digestive enzyme activities of juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). Chinese Journal of Animal Nutrition, 2014, 26(7): 1880–1887 [杨晴, 杨锐, 周歧存, 等. 褐藻糖胶对黄颡鱼幼鱼生长性能和消化酶活性的影响. 动物营养学报, 2014, 26(7): 1880–1887]
- Zhao XD. Food anti nutrition factor. Beijing: China Agricultural University Press, 2015 [赵晓丹. 食物抗营养因子. 北京: 中国农业大学出版社, 2015]
- Zhang Y, Qi ZY, Ning LJ, *et al.* Effect of temperature on growth of juvenile *Fugu rubripes*. Modern Fisheries Information, 2010, 25(12): 29–34 [张云, 齐自元, 宁丽军, 等. 温度对红鳍东方鲀幼鱼生长的影响. 现代渔业信息, 2010, 25(12): 29–34]
- Zhou SQ, You CH, Wang SQ, *et al.* Effects of dietary seaweed *Enteromorpha prolifera* on growth performance, physiological and biochemical characteristics of rabbitfish *Siganus canaliculatus*. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(6): 1257–1265 [周胜强, 游翠红, 王树启, 等. 饲料中添加浒苔对黄斑蓝子鱼生长性能与生理生化指标的影响. 中国水产科学, 2013, 20(6): 1257–1265]
- Zou SG, Tao ZG, Xu Y. The application of DMPT in the nutrition of aquatic animals. Guangdong Feed, 2005, 14(3): 34–35 [邹仕庚, 陶正国, 许毅. DMPT 在水产动物营养中的应用. 广东饲料, 2005, 14(3): 34–35]

Effects of *Gracilaria verrucosa*, *Enteromorpha prolifera*, Algae Residue and Fungi Residue on Growth Performance, and Related Biochemical Indices of Juvenile *Takifugu rubripes*

GUO Bin^{1,2}, LIANG Mengqing^{1①}, XU Houguo¹, WEI Yuliang¹,
ZHANG Qinggong², LI Benxiang², LIAO Zhangbin²

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract This study investigated the effects of dietary fish meal replacement by seaweeds or residues on growth performance and related biochemical indices of juvenile tiger puffer (*Takifugu rubripes*), with 2 fishmeal diets containing 60% and 45% fishmeal as the control 1, and the control 2, and other four diets with 30% fishmeal replaced by 10% four kinds of seaweeds or residues (*Gracilaria verrucosa*, *Enteromorpha prolifera*, Algae residue, Fungi residue) and vegetables protein(wheat gluten, corn gluten meal, and soybean meal), and they were named as C1, C2, JL, HT, ZZ, and JZ. Each diet was fed to three replicates of 25 tiger puffers with initial body weight of (17.33±0.55) g for 56 d. The results showed as follows: The special growth ratio (SGR) of HT group were significantly higher than that of other groups ($P<0.05$). The SGR of ZZ group was significantly higher than C2 and JL groups ($P<0.05$). The feed efficiency ratio (FER) of C1 and HT groups were significantly higher than C2 and JZ groups ($P<0.05$). The protein productive value (PPV) and protein efficiency ratio (PER) of C1 were significantly higher than C2 and JZ groups ($P<0.05$). No significant differences were found in activities of serum glutamic pyruvic transaminase (GPT), serum glutamic oxalacetic transaminase (GOT), liver GPT and liver GOT ($P>0.05$). No significant differences were found in activity of serum superoxide dismutase (SOD) and content of malondialdehyde (MDA). Crude protein content of whole body in JZ group was significantly higher than ZZ group ($P<0.05$). And crude lipid contents in whole body in HT and ZZ groups were significantly higher than C2 group ($P<0.05$). Above results showed that replaced 30% fish meal with 10% *G. verrucosa*, *E. prolifera*, algae residue or fungi residue and vegetable proteins have no adverse effect on the growth performance of juvenile tiger puffer, and *E. prolifera* can significantly improve the growth performance.

Key words Tiger puffer; Seaweed; Growth performance; Biochemical indices

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180511002

http://www.yykxjz.cn/

赵亭亭, 陈超, 邵彦翔. 雌雄条纹锯鲷肌肉营养成分的比较与评价. 渔业科学进展, 2019, 40(3): 151-159
Zhao TT, Chen C, Shao YX. Comparison and evaluation of nutritional components in the muscle of male and female *Centropristis striata*. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(3): 151-159

雌雄条纹锯鲷肌肉营养成分的比较与评价*



赵亭亭^{1,2} 陈超^{1①} 邵彦翔¹

(1. 农业农村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. 水产科学国家级实验教学示范中心 上海海洋大学 上海 201306)

摘要 本研究对雌雄条纹锯鲷(*Centropristis striata*)肌肉的营养成分进行了比较分析,并对其品质进行了评价与对比。结果显示,雌性条纹锯鲷肌肉中的水分极显著低于雄性($P<0.01$),粗脂肪极显著高于雄性($P<0.01$),粗蛋白质和灰分含量无显著差异($P>0.05$)。雌雄条纹锯鲷肌肉中均检测出 16 种氨基酸,除蛋氨酸、赖氨酸和甘氨酸的含量具有显著性差异($P<0.05$)外,其他 13 种氨基酸以及氨基酸总量(TAA)、必需氨基酸总量(EAA)和鲜味氨基酸含量(DAA)都不存在显著性差异($P>0.05$)。依据氨基酸评分标准(AAS)和化学评分标准(CS)分值,雌雄条纹锯鲷肌肉的第一限制性氨基酸均为蛋氨酸,第二限制性氨基酸均为缬氨酸。雄性条纹锯鲷肌肉的必需氨基酸指数高于雌性,雌性为 84.83,雄性为 85.28。其必需氨基酸的组成比例均符合 FAO/WHO 标准。雄性条纹锯鲷肌肉的支链氨基酸和芳香族氨基酸的比值(F 值)略高于雌性,雄鱼为 2.28,雌鱼为 2.24。雄性条纹锯鲷的单不饱和脂肪酸(MUFA)极显著高于雌性($P<0.01$),多不饱和脂肪酸(PUFA)和 EPA+DHA 的含量差异均不显著($P>0.05$)。雄性肌肉的 $\sum n-3\text{PUFA}/\sum n-6\text{PUFA}$ 高于雌性,雄性为 6.43,雌性为 5.51。另外,雄性肌肉的钾钠比(K/Na)也高于雌性,雌鱼为 8.27,雄鱼为 14.27。研究表明,雄性条纹锯鲷比雌性具有更高的食用价值。

关键词 条纹锯鲷; 肌肉; 雌雄; 营养成分; 评价

中图分类号 S965.334 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2019)03-0151-09

条纹锯鲷(*Centropristis striata*)又称美洲黑石斑,常简称为黑石斑,属于鲈形目(Perciformes)、鲷科(Serranidae)、石斑鱼亚科(Serraninae)、锯鲷属(*Centropristis*),是美国大西洋沿岸 3 种重要的经济锯鲷类之一。条纹锯鲷属底栖杂食性鱼类,因其体表绚丽、身形优美,所以有翡翠斑、珍珠斑、天星斑、宝石斑等多种美誉。它的肉质肥美白嫩、口感鲜美嫩滑、

营养丰富且可食比高、肉多无小刺且骨肉易分离,加工方便,符合欧美人的口味,因此深得美国和加拿大广大消费者的喜爱,是重要的经济养殖、商业捕捞、娱乐消遣和观赏鱼种。另外,因其适应性强,属于暖水性的广温、广盐性鱼类,能耐较高的养殖密度,能够很快适应干性颗粒饲料,而且生长快速,抗逆性强,成活率高,所以具有很大的生产潜力,可以在我国温

* 中国-东盟海上合作基金(2016-2018)、农业农村部农业国际合作交流项目-热带国家水产养殖科技创新合作和“海上丝路”国家鱼类养殖关键技术研究共同资助 [This work was supported by China ASEAN Maritime Cooperation Fund Project (2016-2018), Projects of International Exchange and Cooperation in Agriculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of China-Science, Technology and Innovation Cooperation in Aquaculture with Tropical Countries, and Key Techniques of National Fish Culture of Maritime Silk Road]. 赵亭亭, E-mail: 2467832293@qq.com

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

收稿日期: 2018-05-11, 收修修改稿日期: 2018-05-29

带、亚热带海域开展对该种鱼的规模化养殖,其市场发展前景广阔。我国山东省于2002年引入条纹锯鲷(王波等,2003),于2006年驯化及人工繁育成功(雷霖霖等,2007),条纹锯鲷人工养殖与育苗技术的突破,为其养殖产业的兴起与壮大奠定了基础。

目前,国内外对条纹锯鲷的研究均有相关报道,如国外 Charles 等(2004)对该鱼食物种类及投喂频率的研究, Able 等(1997)对条纹锯鲷幼鱼在美国新泽西湾生活习性的研究,国内卢继武等(2006)对其生物学特性与养殖潜力的报道,周书洪等(2008)对其工厂化养殖技术的报道,郭雄通(2009)和周明涛(2011)报道了其网箱养殖的研究,林国清(2012)对条纹锯鲷胚胎发育与规模化繁育技术的报道,张廷廷等(2017)对该种鱼进行了消化系统胚后发育的组织学观察,林星(2011)对其幼鱼配合饲料的研究,陈建国等(2017)对其“突眼症”病症的研究报道,党冉等(2010)对其肌肉营养成分的研究等。但是迄今为止对雌雄亲鱼条纹锯鲷肌肉营养成分的对比评价还没有过相关报道。本研究利用常规肌肉检测方法对雌雄条纹锯鲷肌肉营养成分做了较为系统的测定与比较,以期条纹锯鲷种质标准的建立、保存和合理地加工利用以及在养殖业上条纹锯鲷的选育和改良工作提供基础数据和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用雌雄条纹锯鲷均为本实验室养殖于山东省日照某养殖场的同一批规格一致且体质健壮无伤病的石斑鱼。雌雄鱼均养殖于同一个水泥池中,采用溢流水养殖方式,每天饱食投喂2次(07:00和17:00),饲料蛋白水平52%,脂肪水平8%。雌雄条纹锯鲷的平均体长分别为(26.30±1.31)cm、(25.50±1.27)cm;平均体重分别为(470.00±20.50)g、(450.00±18.90)g。

1.2 样品处理

雌雄条纹锯鲷各取样10尾,样品鱼经MS-222麻醉后,测量体重和体长,清水洗净后解剖,取性腺拍照,做组织切片,每尾鱼取头背部两侧侧线上方至背鳍下面之间的肌肉,编号后在-40℃条件下冷冻保存。待鉴别雌雄后,按雌雄分别将肌肉切小块,雌雄每组样品均3个重复,肌肉混合方法均按照随机分配3尾鱼的肌肉等比例混合为1个样品,然后将剩下的1尾鱼的肌肉平均到3个重复里。用组织粉碎机搅碎、

混匀,置于-40℃备用。肌肉组织样品送青岛市华测检测技术有限公司进行检测。

1.3 雌雄鉴别

本次实验取样正处于亲鱼繁殖期,条纹锯鲷在繁殖期会出现婚姻色,有明显的差异性。在生殖季节,雄性黑石斑鱼鱼嘴至两眼中间直至背鳍鳍条会呈现出明显又绚丽的蓝绿色或翡翠色,自两眼中间的背侧向背面鳍条直至到尾部会出现白色的条纹(贾瑞锦,2014);而雌性黑石斑在体色上可明显区别于雄鱼,表现为光亮的黑灰色,并且腹部明显隆起。另,取肌肉样品时同时取实验鱼的性腺,编号,切小块后 Bouin 氏固定液固定24h,后用梯度酒精脱水浸蜡,石蜡包埋,切片,展片,烤片,脱蜡后染色,中性树胶封片后晾干,光镜下观察、拍照,鉴别雌雄。

1.4 测试项目与方法

采用直接干燥法(GB 5009.3-2016)测定水分含量;使用全自动凯氏定氮仪(GB 5009.5-2010)测定粗蛋白质含量;粗脂肪含量采用索氏抽提法(GB/T 5009.6-2003)测定;灰分测定采用马弗炉550℃高温灼烧法(GB 5009.4-2016)。氨基酸的测定依据 GB/T 5009.124-2003 使用日立 L-8800 型氨基酸分析仪测定。使用美国安捷伦公司 7890A 气相色谱仪(GB/T 22223-2008)测定脂肪酸的含量。采用 GB/T 5009.13、14、87、90、91、92-2003 和 GB 5009.93-2010 方法测定各种矿物质含量。

1.5 营养品质评价方法

根据 FAO/WHO 建议的氨基酸评分标准模式(Pellet *et al*, 1980)和中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所提出的鸡蛋蛋白的氨基酸模式,计算雌雄条纹锯鲷的氨基酸评分(AAS)、化学评分(CS)、必需氨基酸指数(EAAI)及氨基酸的支芳值(F值)。公式如下:

$$AAS = \frac{\text{待测蛋白质中某种必需氨基酸含量(mg/g N)}}{\text{FAO评分模式某种必需氨基酸含量(mg/g N)}}$$

$$CS = \frac{\text{待测蛋白质中某种必需氨基酸含量(mg/g N)}}{\text{鸡蛋蛋白质中某种必需氨基酸含量(mg/g N)}}$$

式中,氨基酸含量指每克氮中氨基酸的毫克数。

$$\text{氨基酸含量(mg/g N)} = \frac{\text{氨基酸含量\% (鲜样)}}{\text{粗蛋白质含量\% (鲜样)}} \times 6.25 \times 1000$$

$EAAI = (100CS_1 \times 100CS_2 \times \dots \times 100CS_n)^{1/n}$ n 为比较的必需氨基酸数。

F 值是支链氨基酸(BCAA)与芳香族氨基酸(AAA)的比值(黄薇等, 2014), 公式如下:

$$F = (\text{缬氨酸} + \text{亮氨酸} + \text{异亮氨酸}) / (\text{苯丙氨酸} + \text{酪氨酸})$$

1.6 数据处理与分析

实验结果用 Excel 2007 进行统计计算, 用 SPSS 17.0 软件中的独立样本 t 检验对数据进行分析, 描述性统计值以平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示。

2 结果与分析

2.1 肌肉常规营养成分

条纹锯鲈雌雄鱼肌肉中的常规营养成分与含量见表 1。研究表明, 雌雄条纹锯鲈肌肉的水分含量和粗脂肪含量差异极显著($P < 0.01$), 粗蛋白质和灰分的含量无显著性差异($P > 0.05$)。其中, 二者肌肉中的粗蛋白质含量均较高, 分别为 20.52%和 20.44%。条纹锯鲈雌鱼肌肉中粗脂肪的含量较高, 为 6.75%; 雄鱼较低, 为 3.42%。

2.2 肌肉氨基酸组成与品质评价

2.2.1 氨基酸组成与含量 雌雄条纹锯鲈肌肉中的氨基酸组成与含量见表 2。条纹锯鲈雌雄鱼肌肉中均检测出 16 种常见氨基酸(样品检测经酸处理, 色氨酸被破坏, 未检测), 包括 7 种人体必需氨基酸(Thr、Val、Met、Ile、Leu、Phe 和 Lys)、2 种半必需氨基酸(His 和 Arg)和 7 种非必需氨基酸(Asp、Glu、Gly、Ala、Tyr、Pro 和 Ser)。条纹锯鲈雌鱼肌肉鲜样中的必需氨基酸含量为 7.81%, 略低于雄鱼(7.87%), 二者差异不显著($P > 0.05$)。雌鱼肌肉中的半必需氨基酸、鲜味氨基酸、氨基酸总量分别占鲜样的 1.72%、7.51%和 19.46%, 雄鱼肌肉中的半必需氨基酸、鲜味氨基酸、氨基酸总量均低于雌鱼, 分别占鲜样的 1.70%、7.40%和 19.33%, 但差异均不显著($P > 0.05$)。条纹锯鲈雌鱼肌肉中非必需氨基酸占肌肉鲜样的 9.93%, 雄鱼肌肉中的非必需氨基酸含量显著低于雌鱼($P < 0.05$), 为

9.76%。条纹锯鲈雌鱼肌肉中必需氨基酸含量与氨基酸总量的比值(W_{EAA}/W_{TAA})与雄鱼相近, 分别为 40.15%和 40.74%, 但条纹锯鲈雌鱼肌肉中必需氨基酸含量与非必需氨基酸含量的比值(W_{EAA}/W_{NEAA})低于雄鱼的, 分别为 78.71%和 80.70%。FAO/WHO 提出, 若蛋白质的必需氨基酸含量占氨基酸总量(W_{EAA}/W_{TAA})的 40%左右, 必需氨基酸含量与非必需氨基酸含量的比值(W_{EAA}/W_{NEAA})在 60%以上则是品质优良的, 符合蛋白质的理想模式(邢旭文等, 2005)。因此, 雌雄条纹锯鲈肌肉氨基酸的组成比值均符合以上指标要求, 说明条纹锯鲈肌肉中的氨基酸具有良好的平衡性, 属于优质的蛋白质源。

在雌雄条纹锯鲈肌肉中检测出的 16 种常见氨基酸中, 氨基酸含量由高到低的顺序几乎一致, 皆是谷氨酸含量最高, 分别为 3.14%和 3.12%, 其次为天门冬氨酸(2.05%和 2.02%)、赖氨酸(1.87%和 1.90%)、亮氨酸(1.69%和 1.69%)。含量较低的氨基酸为以下 4 种: 酪氨酸、丝氨酸、蛋氨酸和组氨酸。二者肌肉中的氨基酸除蛋氨酸、赖氨酸和甘氨酸具有显著性差异($P < 0.05$)外, 其他氨基酸差异均不显著($P > 0.05$)。

2.2.2 肌肉必需氨基酸组成评价 根据蛋白质评价标准, 将雌雄条纹锯鲈肌肉中的必需氨基酸含量转换为每克氮中所含氨基酸的毫克数(mg/g N), 计算出二者肌肉中各个必需氨基酸的 AAS 和 CS 分值和 EAAI(表 3)。由表 3 可知, 雌雄条纹锯鲈肌肉中的必需氨基酸均以蛋氨酸的 AAS 分值最小, 分别为 0.89 和 0.86, 其次是缬氨酸, 分别为 0.90 和 0.96。以 CS 分值为标准时, 二者肌肉中必需氨基酸的 CS 分值最小的也是蛋氨酸, 分别为 0.51 和 0.49, 其次是缬氨酸, 分别为 0.68 和 0.72。由此可见, 不管是 AAS 分值为标准还是以 CS 分值为标准, 雌雄条纹锯鲈亲鱼肌肉的第一限制性氨基酸和第二限制性氨基酸相同, 分别为蛋氨酸和缬氨酸。除蛋氨酸和缬氨酸外, 雌雄条纹锯鲈肌肉中必需氨基酸的 AAS 分值均大于 1。除蛋氨酸外, 雌雄条纹锯鲈肌肉中必需氨基酸的 CS 分值均大于 0.6。这说明条纹锯鲈肌肉的

表 1 雌雄条纹锯鲈肌肉中常规营养成分的比较(湿重, %)

Tab.1 Nutrients in the muscle of female and male *C. striata* (Wet weight, %)

样品 Sample	水分 Moisture	粗蛋白质 Crude protein	粗脂肪 Crude fat	灰分 Ash
♀	72.22 \pm 0.26 ^A	20.52 \pm 0.10	6.75 \pm 0.46 ^A	1.20 \pm 0.11
♂	73.40 \pm 0.34 ^B	20.44 \pm 0.05	3.42 \pm 0.85 ^B	1.44 \pm 0.24

注: 同列数据肩标大写字母不同者表示差异极显著($P < 0.01$), 下同

Note: Values in same row with different superscripts mean highly significant differences ($P < 0.01$), the same as below

表 2 雌雄条纹锯鲂肌肉氨基酸组成及含量(湿重, %)
Tab.2 Amino acids in the muscle of female and male *C. striata* (Wet weight, %)

氨基酸 Amino acids	样品 Samples	
	♀	♂
苏氨酸 Thr [*]	0.96±0.21	0.95±0.08
缬氨酸 Val ^{*※}	0.92±0.02	0.97±0.09
蛋氨酸 Met [*]	0.64±0.01 ^a	0.62±0.01 ^b
异亮氨酸 Ile ^{*※}	0.94±0.02	0.93±0.11
亮氨酸 Leu ^{*※}	1.69±0.01	1.69±0.03
苯丙氨酸 Phe ^{*●}	0.80±0.20	0.81±0.16
赖氨酸 Lys [*]	1.87±0.07 ^a	1.90±0.04 ^b
天门冬氨酸 Asp [#]	2.05±0.09	2.02±0.13
谷氨酸 Glu [#]	3.14±0.10	3.12±0.06
甘氨酸 Gly [#]	1.07±0.02 ^a	1.03±0.02 ^b
丙氨酸 Ala [#]	1.25±0.01	1.23±0.03
酪氨酸 Tyr [●]	0.78±0.01	0.76±0.05
脯氨酸 Pro	0.86±0.08	0.83±0.04
丝氨酸 Ser	0.77±0.06	0.77±0.13
组氨酸 His ^{&}	0.48±0.01	0.47±0.04
精氨酸 Arg ^{&}	1.24±0.22	1.23±0.13
必需氨基酸 Essential amino acids (EAA)	7.81±0.06	7.87±0.09
非必需氨基酸 Nonessential amino acids (NEAA)	9.93±0.04 ^a	9.76±0.08 ^b
半必需氨基酸 Semi-essential amino acids (SEAA)	1.72±0.03	1.70±0.01
鲜味氨基酸 Delicious amino acids (DAA)	7.51±0.02	7.40±0.11
总氨基酸 Total amino acids (TAA)	19.46±0.11	19.33±0.04
支链氨基酸 Branched-chain amino acid (BCAA)	3.55±0.05	3.59±0.55
芳香族氨基酸 Aromatic amino acid (AAA)	1.59±0.01	1.57±0.10
W_{EAA}/W_{TAA}	40.15	40.74
W_{EAA}/W_{NEAA}	78.71	80.70
W_{DAA}/W_{TAA}	38.61	38.27
$F(BCAA/AAA)$	224	228

* 为必需氨基酸, &为半必需氨基酸, #为鲜味氨基酸, ※为支链氨基酸, ●为芳香族氨基酸。同行数据肩标小写字母不同者表示差异显著($P<0.05$), 下同

*: Essential amino acid (EAA); &: Semi-essential amino acid (SEAA); #: Delicious amino acid (DAA); ※: Branched-chain amino acid (BCAA); ●: Aromatic amino acid (AAA). Values in the same row with different superscripts mean significant differences ($P<0.05$), the same as below

必需氨基酸含量丰富且组成相对均衡。雌雄条纹锯鲂肌肉的必需氨基酸指数(EAAI)分别为 84.83 和 85.28。
2.2.3 肌肉鲜味氨基酸组成评价 由表 4 可知,雌雄条纹锯鲂肌肉中的鲜味氨基酸除甘氨酸具有显著性差异外,其他 3 种鲜味氨基酸均无显著性差异。研究结果显示,条纹锯鲂肌肉中的谷氨酸含量可高达

3.14%,天门冬氨酸的含量可高达 2.05%。条纹锯鲂雌雄鱼肌肉中鲜味氨基酸的总量略有差异,分别为 7.51%和 7.40%,但差异不显著($P>0.05$)。雌雄鱼肌肉中鲜味氨基酸分别占氨基酸总量的 38.61%和 38.27%。可见,条纹锯鲂肌肉中鲜味氨基酸含量很高,说明该鱼肉质较为鲜美。

表 3 雌雄条纹锯鲷肌肉中必需氨基酸组成评价
Tab.3 Evaluation on essential amino acid components in the muscle of female and male *C. striata*

必需氨基酸 Essential amino acids	样品 Samples		FAO/WHO 标准 FAO/WHO standard	鸡蛋蛋白标准 Egg protein standard	AAS		CS	
	♀	♂			♀	♂	♀	♂
苏氨酸 Thr	292.40	290.48	250	292	1.17	1.16	1.00	0.99
缬氨酸 Val	280.21	296.60	310	411	0.90 ^{&}	0.96 ^{&}	0.68 ^{&}	0.72 ^{&}
蛋氨酸 Met	194.93	189.58	220	386	0.89 [*]	0.86 [*]	0.51 [*]	0.49 [*]
异亮氨酸 Ile	286.30	284.37	250	331	1.15	1.14	0.86	0.86
亮氨酸 Leu	514.74	516.76	440	534	1.17	1.17	0.96	0.97
苯丙氨酸+酪氨酸 Phe+Tyr	481.24	480.06	380	565	1.27	1.26	0.85	0.85
赖氨酸 Lys	569.57	580.97	340	441	1.68	1.71	1.29	1.32
合计 Total	2619.40	2638.82	2190	2960				
EAAI							84.83	85.28

*为第一限制氨基酸; &为第二限制氨基酸

* means the first limiting amino acids; & means the second limiting amino acids

表 4 雌雄条纹锯鲷肌肉中鲜味氨基酸的组成(湿重, %)
Tab.4 Delicious amino acid contents in the muscle of female and male *C. striata* (Wet weight, %)

样品 Samples	天门冬氨酸 Asp	谷氨酸 Glu	甘氨酸 Gly	丙氨酸 Ala	总量 W _{DAA}
♀	2.05±0.09	3.14±0.10	1.07±0.02 ^a	1.25±0.01	7.51±0.02
♂	2.02±0.13	3.12±0.06	1.03±0.02 ^b	1.23±0.03	7.40±0.11

2.3 脂肪酸组成分析与评价

由表 5 可知, 雌雄条纹锯鲷肌肉中均检测出 17 种脂肪酸, 包括 5 种饱和脂肪酸(SFA)、12 种不饱和脂肪酸(UFA), 其中, 单不饱和脂肪酸(MUFA)5 种, 多不饱和脂肪酸(PUFA)7 种。研究表明, 雌性条纹锯鲷肌肉中 C14 : 0、C15 : 0、C18 : 2n6 的含量显著高于雄性条纹锯鲷($P < 0.05$), C18 : 1n6、C18 : 3n3 的含量极显著高于雄性条纹锯鲷($P < 0.01$); 雄性条纹锯鲷肌肉中 C18 : 0、C18 : 1n9 和 C18 : 1n11 的含量均极显著高于雌性条纹锯鲷($P < 0.01$), 其余脂肪酸的含量差异均不显著。在脂肪酸组成上, 雄性条纹锯鲷的 Σ MUFA 极显著高于雌性($P < 0.01$), Σ SFA 和 Σ PUFA 差异均不显著($P > 0.05$)。另外, 雌性条纹锯鲷的 Σ n-6PUFA 极显著高于雄鱼($P < 0.01$), 而 Σ n-3PUFA 差异不显著($P > 0.05$), 导致了雄性的 Σ n-3PUFA/ Σ n-6PUFA 大于雌性。此外, 雌性条纹锯鲷肌肉中的 EPA+DHA 之和略高于雄性, 但差异不显著($P > 0.05$)。

2.4 矿物元素含量分析

本研究检测了雌雄条纹锯鲷肌肉中的 10 种矿物质元素, 检测结果见表 6。由表 6 可知, 除 Mn 未检出外, 其他 9 种元素均有检出。雌雄条纹锯鲷肌肉中的 Ca 含量均较低, 雌鱼为 77.67 mg/kg, 雄鱼为 69.33 mg/kg。雄性条纹锯鲷肌肉中 Cu 的含量显著高于雌性($P < 0.05$),

P 的含量极显著高于雌性($P < 0.01$); 雌性条纹锯鲷肌肉中 Na 的含量极显著高于雄性($P < 0.01$), 其他元素差异均不显著。二者肌肉中常量元素均是 K 含量最高, 微量元素均为 Zn 含量最高。

3 讨论

3.1 雌雄条纹锯鲷肌肉常规营养成分

条纹锯鲷肌肉中蛋白质和脂肪含量的多少决定了其营养价值的高低。研究表明, 雌雄条纹锯鲷肌肉中的粗蛋白质含量无显著差异, 含量均较高, 雌性略高于雄性, 分别高达 20.52%和 20.44%, 高于棕点石斑鱼 (*Epinephelus fuscoguttatus*)18.80%(郭永军等, 2009)、点带石斑鱼 (*Epinephelus malabaricus*) 19.14%(徐大为等, 2008)、淡水石斑鱼 (*Cichlasoma managuense*)18.90%(黄海等, 2012)、赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*)19.15%(林建斌等, 2010)、珍珠龙胆石斑鱼(♀*Epinephelus fuscoguttatus* × ♂ *Epinephelus lanceolatus*) 19.95%(王际英等, 2015)、云纹石斑鱼 (*Epinephelus moara*) 20.60% (赵亭亭等, 2018)和七带石斑鱼(*Epinephelus septemfasciatus*) 19.60%(程波等, 2009)等多种石斑鱼肌肉的粗蛋白质含量。另外, 本研究中雌雄条纹锯鲷肌肉中粗蛋白质的含量均高于党冉等(2010) 19.09%的研究结果。这可能是受饵料、生长阶段的不同所致, 也可能是受生存环境的影响。

雌性条纹锯鲈肌肉中粗脂肪的含量极显著高于雄性，雌性为 6.75%，雄性为 3.42%。鲭科海产鱼类被认为是低脂鱼类，其粗脂肪含量低于 5%(Periago *et al.*, 2005)，而本研究中雌性条纹锯鲈的粗脂肪含量高达 6.75%，这可能是由于本次取样正处于样品鱼的繁殖期，雌性条纹锯鲈在体内积累储备更多的脂肪，以作为繁育消耗的能量来源。条纹锯鲈雄鱼肌肉中的水分含量极显著高于雌鱼，这说明理论上雄性条纹锯鲈比雌性条纹锯鲈肌肉的肉质更加鲜嫩。因此，条纹锯鲈是一种蛋白质含量丰富的优质海水鱼类，且雄性比雌性的肉质更加鲜嫩，更加低脂。

表 5 雌雄条纹锯鲈肌肉脂肪的脂肪酸组成及含量(湿重, %)

Tab.5 Fatty acids of crude fat in the muscle of female and male *C. striata* (Wet weight, %)

脂肪酸 Fatty acids	♀	♂
C14 : 0*	5.86±0.40 ^a	4.87±0.38 ^b
C15 : 0*	0.63±0.12 ^a	0.53±0.03 ^b
C16 : 0*	23.08±0.74	24.36±1.01
C17 : 0*	0.40±0.02	0.42±0.08
C18 : 0*	3.21±0.08 ^A	4.39±0.11 ^B
C16 : 1 [#]	10.35±0.38	9.44±0.44
C18 : 1n6 [#]	0.51±0.02 ^A	0.39±0.22 ^B
C18 : 1n9 [#]	15.12±0.20 ^A	17.15±0.22 ^B
C18 : 1n9t [#]	-	0.13±0.01
C18 : 1n11 [#]	2.89±0.03 ^A	3.04±0.04 ^B
C20 : 1n7 [#]	1.61±0.13	1.44±0.11
C22 : 1n9 [#]	0.33±0.06	0.36±0.03
C24 : 1 [#]	0.97±0.04	1.02±0.04
C18 : 2n6 ^{&}	2.67±0.09 ^a	2.22±0.01 ^b
C18 : 3n3 ^{&}	1.32±0.06 ^A	1.09±0.08 ^B
C20 : 2 ^{&}	0.18±0.06	0.18±0.05
C20 : 4n6(ARA) ^{&}	0.56±0.04	0.49±0.03
C20 : 5n3(EPA) ^{&}	6.66±0.35	7.17±0.44
C22 : 5n3(DPA) ^{&}	1.13±0.07	1.06±0.09
C22 : 6n3(DHA) ^{&}	11.5±0.76	10.61±0.78
Σ SFA	33.19±1.10	34.58±1.36
Σ MUFA	31.76±0.09 ^A	32.97±0.10 ^B
Σ PUFA	24.02±1.31	22.83±1.33
EPA+DHA	18.16±1.11	17.78±1.19
Σ n-3PUFA	20.61±1.20	19.93±1.28
Σ n-6PUFA	3.74±0.13 ^A	3.10±0.03 ^B
Σ n-3PUFA/Σ n-6PUFA	551.24	642.95

*为饱和脂肪酸；#为单不饱和脂肪酸；&为多不饱和脂肪酸

*: Saturated fatty acid (SFA); #: Monounsaturated fatty acid (MUFA); &: Polyunsaturated fatty acid

表 6 雌雄条纹锯鲈肌肉矿物质含量(湿重, mg/kg)
Tab.6 Contents of minerals in the muscle of female and male *C. striata* (Wet weight, mg/kg)

矿物质元素 Mineral elements (mg/kg)	♀	♂
钾 K	4396.67±164.29	4243.33±175.72
钠 Na	531.33±18.57 ^A	297.33±9.07 ^B
钙 Ca	77.67±3.51	69.33±5.69
镁 Mg	355±25.29	360±24.58
磷 P	2178.67±31.21 ^A	2334.67±42.71 ^B
铜 Cu	0.08±0.01 ^a	0.19±0.03 ^b
锌 Zn	3.27±0.15	3.37±0.15
铁 Fe	1.31±0.14	1.55±0.11
硒 Se	0.36±0.02	0.33±0.04
锰 Mn	-	-
钾/钠 K/Na	8.27	14.27
钙/磷 Ca/P	0.04	0.03

-为未检出

-: Undetectable

3.2 雌雄条纹锯鲈肌肉氨基酸组成与营养品质

研究结果显示，雌雄条纹锯鲈肌肉中均含有 16 种常见氨基酸，除蛋氨酸、赖氨酸和甘氨酸的含量具有显著性差异外，其他氨基酸差异均不显著。雌性条纹锯鲈肌肉中非必需氨基酸的含量显著高于雄性，必需氨基酸含量、氨基酸总量及鲜味氨基酸总量差异均不显著。雌雄条纹锯鲈肌肉中赖氨酸的含量(湿重)分别高达 1.87%和 1.90%，分别占氨基酸总量的 9.61%和 9.83%，赖氨酸含量高。赖氨酸是一种碱性氨基酸，有利于促进钙的吸收。我国居民普遍以谷物为主食，而赖氨酸是一般谷类和人乳蛋白质的第一限制性氨基酸(徐善良等, 2012)，由此雌雄条纹锯鲈均可为国民弥补因以谷物为主食所引起的赖氨酸摄入不足，同时也可以开发为优质的催乳食品(徐革锋等, 2013)。其中由于雄性条纹锯鲈肌肉中必需氨基酸含量略高于雌性且赖氨酸的含量显著高于雌性，所以雄性比雌性具有更高的营养保健价值。

FAO/WHO 根据婴儿的必需氨基酸需求量(各年龄段人群中最高)制定了最低限度的评分标准(AAS)。鸡蛋蛋白质被认为是营养最全面的，因此也被制定为蛋白质的评定标准(CS)(刘俊利等, 2011)。EAAI 以 CS 为参评标准，数值越大，营养价值越高。三者被广泛认为是评定食品中氨基酸营养价值的重要指标。经检测计算可知，不管是以 AAS 分值为标准还是以 CS 分值为标准，雌雄条纹锯鲈的第一限制性氨基酸和第二限制性氨基酸相同，分别为蛋氨酸和缬氨酸。因此，

在对条纹锯鲷进行饲养或食品加工时,额外添加这2种必需氨基酸,能够进一步提高该鱼的鱼肉品质。另外,雄性条纹锯鲷肌肉的EAAI高于雌性,说明以EAAI为标准时,雄性条纹锯鲷的营养价值要优于雌性。

鱼肉的滋味是否鲜美以及鲜美的水平依赖于其肌肉中鲜味氨基酸含量的多少以及组成模式。雌雄条纹锯鲷肌肉中鲜味氨基酸的含量差异不显著。这说明雌雄条纹锯鲷肌肉肉质均较为鲜美。

支链氨基酸可以有效降低胆固醇、保肝控癌。支链氨基酸与芳香族氨基酸的比值称为支芳值,简称 F 值。人和哺乳动物的 F 值在正常情况下为3.0~3.5,而当肝受损伤时,则降为1.0~1.5,因此支链氨基酸可用于治疗肝硬化(黄薇等,2014)。雌雄条纹锯鲷肌肉的 F 值均明显高于人体肝脏受损时的水平,因此,二者肌肉均可作为肝病患者的补充支链氨基酸,具有良好的保肝护肝作用。

3.3 雌雄条纹锯鲷肌肉脂肪酸组成分析与营养品质

脂肪酸是维持细胞正常生理代谢必不可少的营养物质之一。脂肪是食物加热产生香气不可或缺的重要成分,多不饱和脂肪酸含量越高食品加热过程中产生的香气越明显,而且在一定程度上可体现肌肉的多汁性(邴旭文等,2005),并且具有降血脂、降血压、抗肿瘤和调节免疫力的作用(周礼敬等,2013);单不饱和脂肪酸具有降血糖、降血脂,调节胆固醇的功能(王炜等,2005)。检测结果显示,雌雄条纹锯鲷肌肉中的 Σ PUFA差异不显著,雄性条纹锯鲷肌肉中的 Σ MUFA极显著高于雌性。

EPA和DHA是最为重要的不饱和脂肪酸,EPA俗称“血管清道夫”,DHA俗称“脑黄金”,二者均是动物生长发育的必需脂肪酸,具有增强心脑血管健康和促进胎婴儿智力和视力发育的重要作用(周礼敬等,2013)。雌雄条纹锯鲷肌肉中的EPA+DHA的含量分别为18.16%和17.78%,二者差异不显著。因此,条纹锯鲷作为一种优质的海水鱼类,具有一定的保健价值。

多不饱和脂肪酸主要分为n-3和n-6系列, Σ n-3PUFA/ Σ n-6PUFA被作为一个重要的营养价值指标,主要是因为现代人们在膳食中摄入了过多的n-6PUFAs,导致其含量远超出人体需要量,而n-3PUFAs的量严重不足以无法满足需求,从而引发各种现代疾病。雌雄条纹锯鲷肌肉中 Σ n-3PUFA/ Σ n-6PUFA分别为5.51和6.43,该比值雄性高于雌性,所以雄性条纹锯鲷较雌性更能为人类有效补充n-3PUFAs,预防心脑血管疾病、提高人体免疫力。

3.4 雌雄条纹锯鲷肌肉矿物质元素组成评价

随着人们生活水平提高,生活节奏加快,即食品备受欢迎,饮食习惯也普遍偏向高盐高钠,长期食用高盐高钠食品,容易使人患上高血压、糖尿病等多种现代病。本研究检测的雌雄条纹锯鲷肌肉中的10种矿物质元素中,均是K的含量最高,K通常与Na配合发挥作用,维持人体体液的酸碱平衡和神经肌肉的应激性,调节机体渗透压,参与维持机体多种代谢平衡。K可以促进Na的排除,能够通过扩张血管,降低血管阻力从而降低血压。另外,胰岛素的分泌受K的影响,K会刺激胰岛素的分泌,预防糖尿病的发生。因此,K/Na对人体健康至关重要。本研究中雌性条纹锯鲷肌肉中Na的含量极显著高于雄性,K含量差异不显著,雌雄鱼肌肉中的K/Na分别为8.27和14.27。因此,条纹锯鲷适合高血压及心血管疾病患者食用,具有很好的保健价值,理论上,雄性更优于雌性。

对鱼类而言,肌肉中有恒定的钙磷比。检测计算可知,雌性条纹锯鲷肌肉中的Ca/P为0.04,雄性为0.03,均低于珍珠龙胆石斑鱼的0.09(王际英等,2015)、棕点石斑鱼的0.06(郭永军等,2009)、点带石斑鱼1.67(徐大为等,2008)、淡水石斑鱼0.29(黄海等,2012)、七带石斑鱼0.05(程波等,2009)等多种石斑鱼。雌雄条纹锯鲷肌肉中Ca的含量相对较低,仅为77.67、69.33 mg/kg,低于多种鱼类。因此,在配制饲料的过程中,需要注意饲料中的钙磷比例。一般鱼体内钙磷比为0.7~1.6之间(刘修英,1999),鱼类饲料中钙和磷也应有一定比例以满足鱼类正常的生长及繁育过程,但海水鱼除了通过饲料获取Ca这一途径外,还可从水中获取,因此饲料中Ca的添加量还需依据其生存水环境中 Ca^{2+} 的浓度,因此,饲料中的Ca/P一般难以直接确定,需要进一步深入研究。

4 结论

通过对雌雄条纹锯鲷肌肉营养成分的分析与评价可知,雌雄条纹锯鲷均是营养丰富的优质海水经济鱼类。其中雄性条纹锯鲷肌肉的必需氨基酸指数高于雌性,支芳值略高于雌性, Σ n-3PUFA/ Σ n-6PUFA和钾钠比(K/Na)也高于雌性。因此,在食品的食用价值上,雄性略优于雌性。

参 考 文 献

Able KW, Stanton Hales J. Movement of juvenile black sea bass *Centropristis striata* (Linnaeus) in a southern New Jersey

- estuary. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1997, 213(2): 153–167
- Bing XW, Cai BY, Wang LP, *et al.* Evaluation of nutritive quality and nutritional components in *Spinibarbus sinensis* muscle. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2005, 12(2): 211–215 [邴旭文, 蔡宝玉, 王利平, 等. 中华倒刺鲃的肌肉营养成分与品质评价. *中国水产科学*, 2005, 12(2): 211–215]
- Charles FC, Randal LW. Comparison of four commercial diets and three rates for black sea bass *Centropristis striata*, fingerling. *Journal of Applied Aquaculture*, 2004, 16(3–4): 385–394
- Chen JG, Chen C, Li YL, *et al.* Isolation and classification of exophthalmic disease-inducing pathogenic bacterium from *Centropristis striata*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(5): 32–40 [陈建国, 陈超, 李炎璐, 等. 美洲黑石斑鱼 (*Centropristis striata*)“突眼症”的病原菌分离鉴定. *渔业科学进展*, 2017, 38(5): 32–40]
- Cheng B, Chen C, Wang YG, *et al.* Nutritional components analysis and nutritive value evaluation in *Epinephelus septemfasciatus* muscles. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(5): 51–57 [程波, 陈超, 王印庚, 等. 七带石斑鱼肌肉营养成分分析与品质评价. *渔业科学进展*, 2009, 30(5): 51–57]
- Dang R, Zhu JQ, Qiu XZ. Analysis of flesh content and nutrient components in the muscle of *Centropristis striata*. *Journal of Marine Sciences*, 2010, 28(2): 60–66 [党冉, 竺俊全, 邱新志. 美洲黑石斑含肉率及肌肉营养成分分析. *海洋学研究*, 2010, 28(2): 60–66]
- Guo XT. Preliminary investigation on the technology of cage culture of *Centropristis striata*. *Scientific Fish Farming*, 2009(5): 22–23 [郭雄通. 美洲黑石斑网箱养殖技术初探. *科学养鱼*, 2009(5): 22–23]
- Guo YJ, Xing KZ, Xu DW, *et al.* Evaluation of nutritive quality and components in muscle of brownmarbled grouper *Epinephelus fuscoguttatus*. *Fisheries Science*, 2009, 28(11): 635–638 [郭永军, 邢克智, 徐大为, 等. 棕点石斑鱼的肌肉营养成分分析. *水产科学*, 2009, 28(11): 635–638]
- Huang H, Yang N, Zhang X. Analysis of the ration of flesh content and nutrition composition of the muscle of *Cichlasoma managuense*. *Fisheries Science and Technology Information*, 2012, 39(2): 87–91 [黄海, 杨宁, 张希. 淡水石斑鱼含肉率和肌肉营养成分分析. *水产科技情报*, 2012, 39(2): 87–91]
- Huang W, Zhang ZH, Shi YH, *et al.* Analysis and evaluation of nutritional components in muscle of cultured *Synechogobius ommaturus*. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(9): 2866–2873 [黄薇, 张忠华, 施永海, 等. 养殖斑尾复虾虎鱼肌肉营养成分的分析和评价. *动物营养学报*, 2014, 26(9): 2866–2873]
- JIA RJ. Studies on the annual change of ovarian development and regulation technical of sex reversal in *Centropristis striata*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2014, 18–33 [贾瑞锦. 条纹锯鲷 (*Centropristis striata*) 卵巢发育及性逆转调控技术研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2014, 18–33]
- Lei JL, Lu JW. The breed predominance and culture prospects of *Centropristis striata* Linnaeus. *Marine Fisheries Research*, 2007, 28(5): 110–115 [雷霖霖, 卢继武. 美洲黑石斑的品种优势和养殖前景. *海洋水产研究*, 2007, 28(5): 110–115]
- Lin GQ. Studies on embryonic development and scale manual breeding techniques of *Centropristis striata*. *Journal of Fujian Fisheries*, 2012, 34(1): 55–60 [林国清. 美洲黑石斑胚胎发育的观察及其规模化繁育技术研究. *福建水产*, 2012, 34(1): 55–60]
- Lin JB, Chen DH, Zhu QG, *et al.* Nutritional quality and composition in flesh of three species of groupers. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2010, 25(5): 548–553 [林建斌, 陈度煌, 朱庆国, 等. 3种石斑鱼肌肉营养成分分析比较初探. *福建农业学报*, 2010, 25(5): 548–553]
- Lin X. The optimum nutrient requirements of protein, lipid and energy-protein ratio in formulated feed in juvenile *Centropristis striata*. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science)*, 2011, 40(4): 401–406 [林星. 条纹锯鲷幼鱼配合饲料适宜的蛋白质、脂类含量及能蛋比. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2011, 40(4): 401–406]
- Liu JL, Xiong BX, Lü GJ. Comparison on muscle composition of *Hypophthalmichthys molitrix* and *Arisichthys mobilis* in two reservoirs with different trophic levels. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(7): 1098–1104 [刘俊利, 熊邦喜, 吕光俊, 等. 两种不同营养类型水库鲢、鳊肌肉营养成分的比较. *水产学报*, 2011, 35(7): 1098–1104]
- Liu XY. The demand and utilization rate of calcium and phosphorus in feed in fishes. *Henan Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 1999, 20(7): 13 [刘修英. 鱼类对饲料中钙磷的需要和利用率. *河南畜牧兽医*, 1999, 20(7): 13]
- Lu JW, Liu M, Li H. Biological characteristics and aquaculture potential of *Centropristis striata*. *Fishery Modernization*, 2006, 6: 21–22 [卢继武, 刘敏, 李豪. 美洲黑石斑鱼的生物学特性与养殖潜力. *渔业现代化*, 2006, 6: 21–22]
- Pellet PL, Young VR. Nutritional evaluation of protein foods. Food and nutrition. Tokyo: the United National University Publishing Company, 1980, 26–29
- Periago MJ, Ayala MD, Lopez-Albors O, *et al.* Muscle cellularity and flesh quality of wild and farmed sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture*, 2005, 249(1–4): 175–188
- Wang B, Zhu MY, Mao XH. New Breed—*Centropristis striata*. *Hebei Fisheries*, 2003(5): 26–27 [王波, 朱明远, 毛兴华. 养殖新品种—美洲黑石斑鱼. *河北渔业*, 2003(5): 26–27]
- Wang JY, Zhang DR, Ma JJ, *et al.* Nutritional components analysis and nutritive value evaluation of ♀ *Epinephelus fuscoguttatus* × ♂ *E. lanceolatus* muscles. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2015(4): 61–69 [王际英, 张德瑞, 马晶晶, 等. 珍珠龙胆石斑鱼肌肉营养成分分析与品质评价. *海洋湖沼通报*, 2015(4): 61–69]
- Wang W, Zhang HM. Functional properties of monounsaturated fatty acids. *Food and Nutrition in China*, 2005(4): 44–46 [王炜, 张伟敏. 单不饱和脂肪酸的功能特性. *中国食物与营养*, 2005(4): 44–46]
- Xu DW, Xing KZ, Zhang SS, *et al.* Analysis of nutritional components in muscle of *Epinephelus malabaricus*. *Reservoir Fisheries*, 2008, 28(3): 54–56 [徐大为, 邢克智, 张树森, 等. 点带石斑鱼的肌肉营养成分分析. *水利渔业*, 2008, 28(3): 54–56]
- Xu GF, Wang YY, Bai QL, *et al.* Analysis of nutrient components

- and evaluation of nutritive quality in muscle of *Lota lota* (Linnaeus). Chinese Journal of Animal Nutrition, 2013, 25(12): 3027–3032 [徐革锋, 王裕玉, 白庆利, 等. 江鲢肌肉营养成分分析与品质评价. 动物营养学报, 2013, 25(12): 3027–3032]
- Xu SL, Wang DL, Xu JL, *et al.* Analysis and evaluation of nutritional components in muscle of *Pampus argenteus*, *P. cinereus* and *P. sinensis* from the East China Sea. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(4): 775–782 [徐善良, 王丹丽, 徐继林, 等. 东海银鲳(*Pampus argenteus*)、灰鲳(*P. cinereus*)和中国鲳(*P. sinensis*)肌肉主要营养成分分析与评价. 海洋与湖沼, 2012, 43(4): 775–782]
- Zhang TT, Chen C, Shao YX, *et al.* Histological observation on post-embryonic development of digestive system of *Centropristis striata*. Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(3): 78–85 [张廷廷, 陈超, 邵彦翔, 等. 美洲黑石斑鱼(*Centropristis striata*)消化系统胚后发育的组织学观察. 渔业科学进展, 2017, 38(3): 78–85]
- Zhao TT, Zhang Y, Chen C, *et al.* Analysis of nutrient components and evaluation of nutritive quality in flesh of three species of cultured groupers. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(6): 89–96 [赵亭亭, 张岩, 陈超, 等. 3种养殖石斑鱼的肌肉营养成分分析与品质评价. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 89–96]
- Zhou LJ, Shen DX, Zhan HX. Studies on the nutritional components of fish muscles and human health. Animal Husbandry and Feed Science, 2013, 34(5): 69–71 [周礼敬, 沈东霞, 詹会祥. 鱼类肌肉营养成分与人体健康研究. 畜牧与饲料科学, 2013, 34(5): 69–71]
- Zhou MT. Experiment on sea cage culture of induced *Centropristis striata*. Modern Fisheries Information, 2011, 26(8): 28–29 [周明涛. 引进美洲黑石斑海水网箱养殖试验. 现代渔业信息, 2011, 26(8): 28–29]
- Zhou SH, Jiang T, Xiao WQ, *et al.* Industrial aquaculture of *Centropristis striata*. China Fisheries, 2008(11): 64 [周书洪, 姜涛, 肖文青, 等. 美洲黑石斑工厂化养殖技术. 中国水产, 2008(11): 64]

(编辑 陈辉)

Comparison and Evaluation of Nutritional Components in the Muscle of Male and Female *Centropristis striata*

ZHAO Tingting^{1,2}, CHEN Chao¹*, SHAO Yanxiang¹

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract *Centropristis striata* is an economically important marine fish worldwide. In this study, the nutritional content in the muscle of *C. striata* was compared and evaluated by routine biochemical analysis methods between males and females. The results showed that the female *C. striata* contained significantly lower moisture than the males ($P < 0.01$). However, the crude fat content in the fresh muscle of females was significantly higher ($P < 0.01$) than that in the muscle of males. There was no significant difference in the crude protein and crude ash content in fresh muscle between females and males ($P > 0.05$). Sixteen common amino acids were detected in the muscles of both males and females. Except for methionine, lysine, and glycine content, there were no significant differences between the other 13 amino acids, total amino acids (TAA), essential amino acids (EAA), and delicious amino acids (DAA) ($P > 0.05$). According to the amino acid score (AAS) and chemical score (CS), the first limiting amino acid for both male and female *C. striata* was methionine, and the second was valine. The essential amino acids index (EAAI) of the male *C. striata* was 85.28, a little higher than that of female *C. striata* (84.84). The composition proportions of the essential amino acids in the muscles of *C. striata* are all in accordance with the FAO/WHO Standard. The ratios of branched chain amino acids to aromatic amino acids (F values) in the flesh of male and female *C. striata* were 2.28 and 2.24, respectively. The monounsaturated fatty acid (MUFA) concentration in the male *C. striata* was higher than that in females, the difference was highly significant ($P < 0.01$), but the polyunsaturated fatty acid (PUFA) and EPA+DHA (Eicosapentenoic acid+docosahexenoic acid) content were not significantly different between the males and females. The ratio of $\sum n-3$ PUFA to $\sum n-6$ PUFA in the flesh of the male *C. striata* was 6.43, which was higher than that of the females (5.51). In addition, the ratio of K to Na in the muscles of the males (14.27) was higher than that of the females (8.27). In conclusion, it can be suggested that male *C. striata* has a higher edible value than females.

Key words *Centropristis striata*; Muscle; Male and female; Nutritional component; Evaluation

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180208002

http://www.yykxjz.cn/

王晓艳, 乔洪金, 黄炳山, 王成强, 李培玉, 李宝山, 王际英. 5种海藻在刺参幼参饲料中的应用研究. 渔业科学进展, 2019, 40(3): 160-167

Wang XY, Qiao HJ, Huang BS, Wang CQ, Li PY, Li BS, Wang JY. Application research of five seaweeds in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(3): 160-167

5 种海藻在刺参幼参饲料中的应用研究*

王晓艳 乔洪金 黄炳山 王成强 李培玉 李宝山 王际英^①

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

摘要 本研究通过分析刺参(*Apostichopus japonicus*)幼参[(10.02±0.03) g]生长性能、体组成、肠道消化酶活性及非特异性免疫性能的变化,评价鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*)、铜藻(*Sargassum horneri*)、海带(*Saccharina japonica*)、海带渣、石莼(*Ulva lactuca* L.)及混合藻粉在刺参幼参养殖中的应用效果,在室内循环水系统中进行了为期 56 d 的养殖实验。结果显示,1) 鼠尾藻和混合藻粉组刺参的增重率(WGR)和特定生长率(SGR)极显著高于其他各藻粉组($P<0.01$),海带渣组刺参的 WGR 和 SGR 最低,肠体比(IBR)和脏体比(VBR)均显著低于其他各组($P<0.05$),藻粉对刺参存活率(SR)影响不显著($P>0.05$); 2) 不同藻粉对刺参体壁水分、粗灰分、粗蛋白和粗脂肪影响不显著($P>0.05$); 3) 鼠尾藻和混合藻粉组肠道胰蛋白酶活性极显著高于海带、海带渣和石莼组,海带渣组最低($P<0.01$); 藻粉对 α -淀粉酶和脂肪酶活性无显著影响($P>0.05$),但对刺参粪便的酸不溶性灰分具有极显著影响($P<0.01$); 4) 鼠尾藻组和混合藻粉组刺参肠道超氧化物歧化酶(T-SOD)、酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(AKP)活性极显著高于其他各组($P<0.01$),海带渣组丙二醛(MDA)含量极显著高于其他各组($P<0.01$)。研究表明,在本实验条件下,综合考虑刺参的生长性能及非特异性免疫性能,添加任一海藻均未达到替代鼠尾藻的饲喂效果,但多种海藻混合添加,其生长性能及非特异性免疫性能与单独添加鼠尾藻效果一致。

关键词 刺参; 鼠尾藻; 海藻粉; 生长性能; 消化酶; 非特异性免疫性能

中图分类号 S963.71 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)03-0160-08

仿刺参(*Apostichopus japonicus*),也称为刺参,是经济效益很高的培养殖种类之一。海参作为世界八大珍品之一,以高蛋白、黏多糖丰富及不含胆固醇著称,随着其价值知识的普及,刺参逐渐进入寻常百姓餐桌。刺参需求量的增大,引起养殖产业和饲料产业的迅速扩大,而关于海参营养需求的研究尚处于摸索阶段,营养需求标准缺乏,饲料研究落后于产业的发

展。鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*)和马尾藻(*Sargassum*)被认为是最优质的刺参饵料,由于过度开采已经不能满足产业发展的需要。天然海域中,刺参主要以沉积物中的单细胞藻类、原生动物、细菌、大型海藻碎屑及海泥为食,因为刺参优先选择栖息在富含大型海藻的海域,充足的大型海藻碎屑是海参的主要食物来源,所以大型海藻成为人工配合饲料的主要原料。目

* 国家海洋公益性行业科研专项(201505022-5)、烟台市重点研发计划(2017ZH066)和山东省现代农业产业技术体系-刺参创新团队建设(SDAIT-22-06)共同资助 [This work was supported by Research Project of Marine Public Welfare Industry (201505022-5), Key Research and Development Project of Yantai City (2017ZH066) and Modern Agricultural Industry Technology System of Shandong Province-Innovative Team of Sea Cucumber (SDAIT-22-06)]. 王晓艳, E-mail: wangxy1109s@126.com

^① 通讯作者: 王际英, 研究员, E-mail: ytwjy@126.com

收稿日期: 2018-02-08, 收修改稿日期: 2018-04-12

前已有不少研究报道,部分大型海藻用于刺参养殖取得了不错的投喂效果(Wen *et al.*, 2016; 殷旭旺等, 2015; 李猛等, 2017; 唐薇等, 2014; 葛立保等, 2017; 朱建新等, 2007)。石莼(*Ulva lactuca* L.)和海带(*Saccharina japonica*)是中国北方很受欢迎且价格较低的大型海藻,含有丰富的纤维素、碳水化合物、蛋白质、各种微量元素和多糖类,目前已广泛应用于刺参养殖中。铜藻(*Sargassum horneri*)是中国暖温带海域浅海区海藻场的主要连片大型褐藻物种,植株高大,枝叶繁茂,多生长在潮下带浅海岩礁上,成片漂浮水面,堪称“海中森林”,铜藻不但含有丰富的藻胶、纤维素、半纤维素及矿物质,而且生物活性物质含量相当高,作为工业、食品原料资源具有极大的开发潜力,可惜目前还没有被广泛开发利用(郑海羽等, 2008)。海带渣为工业提胶的剩余产品,干海带加水浸泡后切碎,甲醛固色,在加热条件下,利用碳酸氢钠消化后过滤,滤液用于提取海藻酸钠,不溶性组分干燥后得到海带渣原料,所以,海带经过有效成分提取后,仍存在许多粗蛋白、粗纤维和矿物质等营养物质,用来制作刺参饵料可实现海带渣的高值化利用,这一部分资源的利用可使海带干物质的利用率高达45%左右(张俊杰等, 2010)。本研究在刺参幼参配合饲料中添加海带粉、海带渣粉、铜藻粉及石莼粉,与鼠尾藻的饲喂效果作对比研究,并探讨混合藻粉的应用效果,以期大型海藻在刺参人工配合饲料中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

以鱼粉、小麦粉、海泥等为主要原料,对照组为鼠尾藻粉(D1 购自莱州市海福饲料有限公司),分别用铜藻粉(D2 采集于江苏省盐城市大丰区养殖水域; 菌落总数 20840 CFU/g; 大肠杆菌 16 MPN/100 g; 沙门氏菌、副溶血弧菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌均未检出)、海带粉(D3 购自青岛汇福林海洋生物科技有限公司)、海带渣(D4 购自青岛汇福林海洋生物科技有限公司)、石莼粉(D5 购自青岛海之源饲料科技有限公司)及5种海藻粉等比例混合(1:1:1:1:1; D6)替代鼠尾藻,配制成6种实验饲料,每种实验饲料包含30%的藻粉。将所有实验原料逐级混匀,与适量新鲜蒸馏水混合,用螺旋挤压机加工成厚度为2 mm的片状饲料,室温风干至水分为5%左右,储存于-20℃冰箱备用。饲料配方及基本营养组成见表1,实验饲料氨基酸组成见表2。

1.2 饲养管理

实验用刺参幼参购于山东安源水产股份有限公司,正式实验前,于实验所用循环水养殖系统中,用对照组(鼠尾藻组)饲料投喂14 d,使刺参幼参适应养殖系统的条件及实验饲料。选取540头规格统一、体质健康、初始体重为(10.02±0.03) g的刺参随机分配到18个玻璃钢水槽内(Φ 65 cm×80 cm),实验分为6组,每组3个平行,每个平行30头刺参,每个桶内放置2个聚乙烯波纹板管作为刺参的遮蔽物。每天定时定量投喂1次(16:00),初始投喂量为刺参总湿重的2%,观察摄食情况并及时调整投喂量。每3 d采用虹吸法吸出残饵及粪便,实验周期为56 d,实验期间每天换水量为1/3,控制水温为(18±2)℃,溶氧>6 mg/L, pH为7.6~8.2,盐度为28~32, NO₂⁻-N<0.05 mg/L, NH₄⁺-N<0.05 mg/L,光照周期为自然光周期。

1.3 样品采集

实验中期开始收集刺参粪便,用镊子从每个桶内小心夹取完整粪便,用电热鼓风干燥箱60℃烘干,用于酸不溶性灰分的测定。饲养结束后禁食48 h,分别对每桶刺参进行计数并称总重,每桶随机选取10头刺参,解剖分离内脏、体壁及肠道,称重后保存于-80℃冰箱备用。另每桶随机取3头刺参,沿腹中线的右侧解剖(避免破坏腹肠系膜),剔除呼吸树后,取中肠0.8 cm左右并固定于Bouin's液中24 h后,保存于70%酒精中,经脱水、透明、浸蜡、包埋后,进行常规石蜡连续切片,切片厚度为7.0 μm,然后经H.E染色后,中性树脂封片并编号,在徕卡高清摄像系统(LEICA ICC50 HD)下观察并拍照。从-80℃冰箱中取出刺参肠道,冰浴解冻匀浆,4℃离心20 min(2500 r/min),上清液(粗酶液)于4℃保存,用于消化酶和免疫酶活性的测定(24 h内测定)。

1.4 计算公式与实验方法

增重率(Weight gain rate, WGR, %),特定生长率(Specific growth rate, SGR, %/d),存活率(Survival rate, SR, %),肠体比(Ratio of intestine weight to body weight, IBR, %),脏体比(Ratio of viserosomatic weight to body weight, VBR, %),根据以下公式计算:

$$WGR=(W_f-W_i) \times 100/W_i;$$

$$SGR=(\ln W_f-\ln W_i) \times 100/T;$$

$$SR=(\text{存活数量}/\text{初始数量}) \times 100;$$

$$IBR=(\text{肠道质量}/\text{体重}) \times 100;$$

$$VBR=(\text{内脏质量}/\text{体重}) \times 100$$

式中, W_i 和 W_f 分别为每个桶内刺参的平均初始

表1 饲料配方及营养组成(%)
Tab.1 Composition and nutrient levels of the experimental diets (%)

原料 Ingredients	组别 Groups					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
鱼粉 Fish meal	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
海藻粉 Seaweeds	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
小麦粉 Wheat meal	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
微晶纤维素 Microcrystalline cellulose	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
海泥 Sea mud	36.4	36.4	36.4	36.4	36.4	36.4
大豆卵磷脂 Soy lecithin	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
破壁酵母 Wall-broken yeast	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
黄原胶 Xanthan gum	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
瓜尔豆胶 Guar gum	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
抗氧化剂 Antioxidant	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
维生素预混料 Vitamin premix ^a	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
矿物质预混料 Mineral premix ^b	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
合计 Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
营养组成(干物质) Nutrient composition (Dry Matter):						
粗蛋白 Crude protein(%)	15.26	14.46	16.64	16.83	16.23	15.90
粗脂肪 Crude lipid(%)	1.54	1.91	1.80	1.73	1.41	1.80
粗灰分 Crude ash(%)	50.03	53.06	47.99	46.32	48.14	49.21
能量 Energy (kJ/g)	11.57	10.58	12.30	12.73	12.12	11.94

a 维生素预混料(mg/kg 饲料): 维生素 A, 38.0; 维生素 B₁, 115.0; 维生素 B₂, 380.0; 维生素 B₁₂, 1.3; 维生素 D₃, 13.2; α -生育酚, 210.0; 烟酸, 1030.0; 泛酸, 368.0; 生物素, 10.0; 叶酸, 20.0; 抗坏血酸, 500.0; 盐酸吡哆醇, 88.0; 肌醇, 4000.0

b 矿物质预混料(mg/kg 饲料): KCl, 3020.5; KAl(SO₄)₂, 11.3; NaCl, 100.0; KI, 7.5; NaF, 4.0; ZnSO₄·7H₂O, 363.0; CuSO₄·5H₂O, 8.0; MgSO₄·7H₂O, 3568; MnSO₄·4H₂O, 65.1; Na₂SeO₃, 2.3; NaH₂PO₄·2H₂O, 25558.0; CoCl₂, 28.0; C₆H₅O₇Fe·5H₂O, 1523.0; Ca-lactate, 15978.0

a Vitamin mixture (mg/kg diet): vitamin A, 38.0; thiamine, 115.0; riboflavin, 380.0; vitamin B₁₂, 1.3; vitamin D₃, 13.2; α -tocopherol, 210.0; nicotinic acid, 1030.0; pantothenic acid, 368.0; biotin, 10.0; folic acid, 20.0; ascorbic acid, 500.0; pyridoxine hydrochloride, 88.0; inositol, 4000.0

b Mineral mixture (mg/kg diet): KCl, 3020.5; KAl(SO₄)₂, 11.3; NaCl, 100.0; KI, 7.5; NaF, 4.0; ZnSO₄·7H₂O, 363.0; CuSO₄·5H₂O, 8.0; MgSO₄·7H₂O, 3568; MnSO₄·4H₂O, 65.1; Na₂SeO₃, 2.3; NaH₂PO₄·2H₂O, 25558.0; CoCl₂, 28.0; C₆H₅O₇Fe·5H₂O, 1523.0; Ca-lactate, 15978.0

体质量和终末体质量, T 为养殖天数。

饲料及刺参体壁的水分、粗灰分、粗脂肪及粗蛋白含量分别根据 GB/T6435-2006、GB/T6433-2007、GB/T6433-2006 和 GB/T5009.5-2003 测定, 饲料能量采用氧弹燃烧法测定(PARR 6100), 酸不溶性灰分(Acid-insoluble ash)根据 GB/T23742-2009 测定; 肠道粗酶液蛋白浓度(考马斯亮蓝法)、胰蛋白酶(Trypsin)、糜蛋白酶(Chymotrypsin)、 α -淀粉酶(α -Amylase)、脂肪酶(Lipase)、总超氧化物歧化酶(Total-superoxide dismutase, T-SOD)、碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AKP)、酸性磷酸酶(Acid phosphatase, ACP)活性及丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量均采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定, 测定方法均参考试剂盒说明书; 饲料氨基酸测定参照国标测定方法(GB/T 14924.10-2008), 采用全自动氨基酸测定仪(Hitachi L-8900, 日本)测定。

1.5 数据分析

所有数据采用 SPSS 18.0 进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 用 Duncan's 检验进行多重比较, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著, $P > 0.05$ 为差异不显著。统计数据以平均值 \pm 标准误(Mean \pm SE)的形式表示。

2 结果

2.1 不同藻粉对刺参生长性能、形体指标及存活率的影响

不同海藻粉对刺参的生长性能具有显著影响, 如表 3 结果显示, 混合藻粉组与对照组的刺参 WGR 和 SGR 显著高于其他各组($P < 0.01$), 铜藻组与海带组差异不显著($P > 0.05$), 但显著低于石莼组($P < 0.01$), 海带渣组最低; 海带渣组刺参的 IBR 和 VBR 均显著

表 2 实验饲料氨基酸组成(干物质基础, %)
Tab.2 Amino acids composition of experimental diets (Dry matter basis, %)

氨基酸 Amino acids	组别 Groups					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
精氨酸 Arg	0.77	0.78	0.90	0.89	0.90	0.82
组氨酸 His	0.26	0.27	0.27	0.28	0.28	0.27
异亮氨酸 Ile	0.45	0.47	0.56	0.58	0.57	0.51
亮氨酸 Leu	0.97	0.99	1.20	1.21	1.17	1.07
赖氨酸 Lys	0.83	0.90	0.91	0.89	0.88	0.85
蛋氨酸 Met	0.33	0.25	0.43	0.43	0.43	0.40
苯丙氨酸 Phe	0.59	0.61	0.74	0.74	0.73	0.66
苏氨酸 Thr	0.63	0.64	0.78	0.79	0.76	0.70
缬氨酸 Val	0.57	0.59	0.71	0.73	0.72	0.64
天冬氨酸 Asp	1.33	1.49	1.67	1.66	1.59	1.51
丝氨酸 Ser	0.75	0.76	0.88	0.89	0.86	0.81
甘氨酸 Gly	0.92	0.94	1.11	1.10	1.07	1.00
丙氨酸 Ala	0.86	0.91	1.07	1.06	1.04	0.96
半胱氨酸 Cys	0.19	0.18	0.24	0.25	0.23	0.22
酪氨酸 Tyr	0.41	0.37	0.41	0.40	0.38	0.40
谷氨酸 Glu	3.33	2.78	3.08	3.09	3.00	3.00
脯氨酸 Pro	0.74	0.78	0.90	0.90	0.87	0.82
总氨基酸 TAA	13.93	13.71	15.86	15.89	15.48	14.64
海藻粉营养成分 (干物质) Seaweeds nutrients (Dry Matter)						
粗蛋白 Crude protein(%)	16.08	13.18	19.53	20.86	18.25	17.60
粗脂肪 Crude fat (%)	1.24	1.26	2.02	1.98	1.42	1.62

表 3 不同藻粉对刺参生长性能、形体指标及存活率的影响

Tab.3 Effects of different seaweeds on the growth performance, morphological parameters and survival rate of *A. japonicus*

项目 Items	组别 Groups					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
初始体重 W_i (g)	10.01±0.01	10.02±0.02	10.04±0.01	10.04±0.03	10.02±0.03	10.01±0.01
末体重 W_f (g)	18.83±0.23 ^a	13.17±0.07 ^c	13.31±0.09 ^{bc}	11.19±0.11 ^d	13.72±0.07 ^b	18.92±0.16 ^a
增重率 WGR (%)	88.33±2.33 ^a	31.29±0.23 ^c	32.76±0.93 ^c	11.37±0.57 ^d	36.97±0.60 ^b	89.20±1.60 ^a
特定生长率 SGR (%/d)	1.13±0.02 ^a	0.49±0.00 ^c	0.51±0.01 ^c	0.19±0.01 ^d	0.56±0.01 ^b	1.14±0.02 ^a
肠体比 IBR (%)	3.34±0.04 ^{ab}	3.37±0.05 ^a	3.26±0.05 ^{ab}	2.37±0.09 ^c	3.16±0.03 ^b	3.39±0.05 ^a
脏体比 VBR (%)	7.84±0.38 ^a	7.12±0.37 ^a	7.44±0.35 ^a	5.77±0.27 ^b	7.49±0.15 ^a	7.75±0.34 ^a
存活率 SR (%)	91.67±1.67	88.33±1.67	88.33±1.67	83.33±0.00	95.00±5.00	88.89±1.11

注: 同一行肩标不同表示不同组间差异显著($P<0.05$), 下表同

Note: Values within the same row with different letters are significantly different ($P<0.05$), the same as below

表 4 不同海藻粉对刺参体壁组成的影响

Tab.4 Effects of different seaweeds on the body wall composition of *A. japonicus*

项目 Items	组别 Groups					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
水分 Moisture (%)	90.80±0.35	91.30±0.08	90.72±0.15	90.58±0.20	91.05±0.21	91.32±0.06
粗蛋白 Crude protein (%)	42.96±0.44	42.71±0.35	43.46±0.07	43.63±0.62	43.63±0.23	43.70±0.09
粗脂肪 Crude fat (%)	3.58±0.26	3.66±0.05	3.58±0.09	3.94±0.14	3.63±0.02	3.77±0.10
粗灰分 Crude ash (%)	36.23±0.04	37.30±0.24	35.92±0.29	36.73±0.16	36.22±0.43	36.44±0.51

低于其他各组($P<0.05$), 其他各组间差异不显著($P>0.05$);不同海藻粉对刺参SR影响不显著($P>0.05$)。

表 4 结果显示, 饲料中添加海带、海带渣、石莼及混合藻粉均能提高刺参的体壁粗蛋白含量, 但与对照组差异不显著($P>0.05$), 不同海藻粉对刺参体壁水分、粗灰分和粗脂肪影响不显著($P>0.05$)。

2.2 不同海藻粉对刺参消化酶活性的影响

鼠尾藻和混合藻粉组刺参肠道胰蛋白酶活性显著高于海带、海带渣和石莼组($P<0.05$), 铜藻组与对照组差异不显著($P>0.05$); 海带渣及石莼粉组刺参肠道的糜蛋白酶活性显著低于其他各组($P<0.05$), 其他各组间差异不显著($P>0.05$); 不同处理组 α -淀粉酶和脂肪酶活性差异不显著($P>0.05$); 铜藻组刺参粪便的酸不溶性灰分显著高于对照组($P<0.01$), 其他各组均显著低于对照组($P<0.01$)(表 5)。

2.3 不同海藻对刺参非特异性免疫性能的影响

由表 6 可见, 不同海藻对刺参非特异性免疫具有显著影响, 海带渣组刺参肠道 T-SOD 活性显著低于其他各组($P<0.01$), 混合藻粉组显著高于铜藻、海带及石莼组($P<0.01$); 海带渣组刺参肠道 MDA 含量显著高于其他各组($P<0.01$), 石莼组显著低于对照组($P<0.01$), 混合藻粉组与对照组差异不显著($P>0.05$); 不同藻粉对刺参的 ACP、AKP 活性具有显著影响($P<0.01$), 海带渣组刺参的 ACP 活性显著低于对照

表5 不同海藻粉对刺参消化酶活性的影响
Tab.5 Effects of different seaweeds on the digestive enzyme activities of *A. japonicus*

项目 Items	组别 Groups					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
胰蛋白酶 Trypsin (U/mg prot)	820.93±21.13 ^a	798.95±42.57 ^{ab}	714.61±27.94 ^{bc}	630.35±24.67 ^c	720.34±13.07 ^b	816.15±26.80 ^a
糜蛋白酶 Chymotrypsin (U/mg prot)	4.39±0.26 ^a	4.30±0.14 ^{ab}	3.75±0.15 ^{bc}	3.39±0.11 ^c	3.55±0.14 ^c	4.29±0.18 ^{ab}
α -淀粉酶 α -Amylase (U/mg prot)	1.13±0.03	1.24±0.06	1.07±0.06	1.09±0.07	1.07±0.06	1.24±0.07
脂肪酶 Lipase (U/g prot)	6.32±0.27	5.60±0.09	6.20±0.35	5.83±0.20	6.53±0.14	6.52±0.20
酸不溶性灰分 Acid-insoluble ash(%)	42.24±0.22 ^b	43.52±0.16 ^a	39.71±0.15 ^d	41.85±0.24 ^b	40.75±0.15 ^c	40.47±0.13 ^c

表6 不同海藻对刺参非特异性免疫性能的影响
Tab.6 Effects of different seaweeds on the nonspecific immune performance of *A. japonicus*

项目 Items	组别 Groups					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
总超氧化物歧化酶 T-SOD(U/mg prot)	20.99±1.07 ^{ab}	18.81±1.00 ^b	19.14±0.82 ^b	14.96±0.60 ^c	18.37±0.12 ^b	22.65±1.30 ^a
丙二醛 MDA(nmol/mg prot)	1.44±0.04 ^b	1.36±0.07 ^{bc}	1.29±0.06 ^{bc}	2.01±0.11 ^a	1.17±0.08 ^b	1.31±0.04 ^{bc}
酸性磷酸酶 ACP(U/g prot)	134.22±6.92 ^{ab}	119.04±3.45 ^{bc}	129.21±4.45 ^{ab}	111.19±2.93 ^c	129.57±4.18 ^{ab}	138.33±8.25 ^a
碱性磷酸酶 AKP(U/g prot)	457.58±11.64 ^a	366.27±17.56 ^{bc}	418.42±14.20 ^{ab}	352.44±16.66 ^c	385.15±20.42 ^{bc}	461.99±11.38 ^a

组及混合藻粉组($P<0.01$), 其余各组与对照组差异不显著($P>0.05$); 铜藻、海带渣及石莼组肠道 AKP 活性显著低于对照组($P<0.01$), 混合藻粉组与对照组差异不显著($P>0.05$)。

2.4 不同海藻对刺参肠道组织结构的影响

图1为6组饲料投喂下刺参的中肠横切组织结构。由图1可见, 不同海藻对刺参肠道组织结构影响

显著, 鼠尾藻和混合藻粉组刺参肠道皱襞高度明显大于其他各组, 且皱襞面积较大, 铜藻组及海带渣组皱襞高度最小, 且皱襞面积最小, 海带组及石莼组皱襞高度居中。

3 讨论

海藻为刺参生长所必需, 饲料中添加30%的藻粉

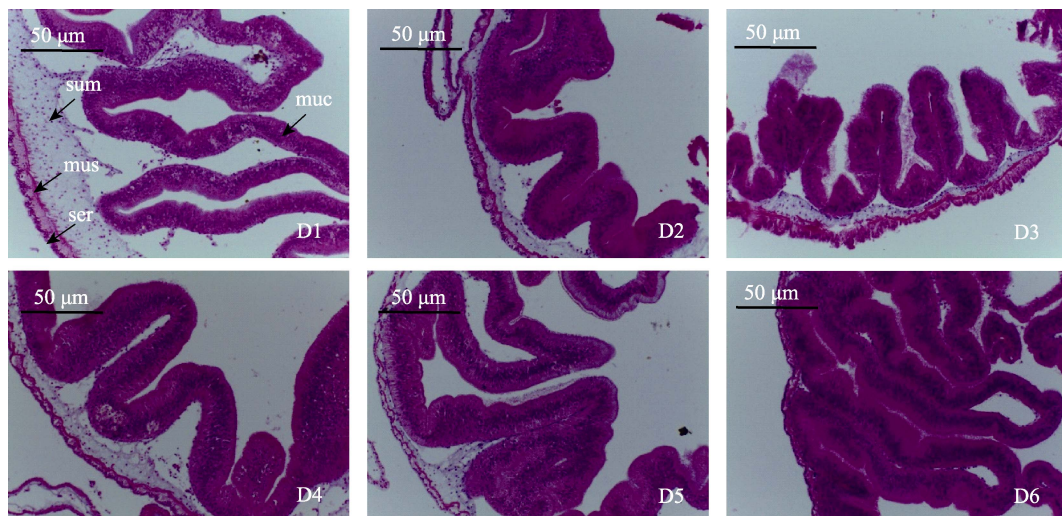


图1 不同海藻对刺参肠道组织结构的影响

Fig.1 Effects of different seaweeds on intestinal tissue structure of *A. japonicus*

D1~D6 分别为鼠尾藻、铜藻、海带、海带渣、石莼及混合藻粉组刺参的肠道结构;

muc: 黏膜层; sum: 黏膜下层; mus: 肌肉层; ser: 浆膜层

D1~D6 were intestinal structure of *A. japonicus* in group of *S. thunbergii*,

S. horneri, *S. japonica*, degummed kelp, *U. lactuca* L., and their mixture, respectively;

muc: mucosa; sum: submucosa; mus: muscle; ser: serosa

能最大程度提高刺参的生长性能(Yuan *et al*, 2006), 而鼠尾藻是公认的刺参优质饵料, 在本实验条件下, 铜藻粉、海带粉、海带渣及石莼粉对刺参的增重效果均不如鼠尾藻, 然而, 混合藻粉却达到了与鼠尾藻相同甚至更优的增重效果, 这可能是因为, 多种海藻粉混合营养更全面, 弥补了单一海藻营养不均衡的问题, 与 Gao 等(2011)对刺参的研究结果一致。铜藻的氨基酸组成与鼠尾藻相似(表 2), 但促生长效果却明显不及鼠尾藻, 可能是因为其谷氨酸含量(2.78)明显低于鼠尾藻组(3.33), 而谷氨酸是一种呈味氨基酸(刘长琳等, 2015), 能增强动物食欲, 提高摄食量。本研究中海带渣组刺参的 IBR 和 VBR 均显著低于其他各组, 可能是因为海带渣在提取褐藻酸钠过程中, 为了保证提取物的色泽而加入的甲醛等固色剂部分残留, 影响了刺参的消化功能, 而海带渣组的 SR 与其他各组差异不显著, 表明海带渣对刺参的 SR 无不利影响, 但不利于肠道的消化吸收, 郝继浦(2014)研究表明, 利用海带渣生产刺参饵料, 刺参的生长性能显著低于配合饲料组($P < 0.05$), 与本研究结果相似。

刺参食道和胃都很短, 仅起到运输和机械处理内吞食物的作用, 刺参无特化的消化腺(崔龙波等, 2000; 李旭等, 2013), 前肠和中肠有腺细胞, 能分泌消化酶, 对食物进行细胞外消化(王吉桥等, 2007), 本研究中, 刺参肠道蛋白酶活性较高, 且受不同藻类影响显著, 而脂肪酶活性较低, 表明刺参对不同藻类蛋白的吸收能力不同, 对脂肪的耐受性低(Seo *et al*, 2011), 多项研究也证明了刺参肠道具有较高的蛋白酶活性和较低的脂肪酶活性(唐黎等, 2007; 姜令绪等, 2007; 赵斌等, 2015), 与本研究结果一致。铜藻和海带渣组刺参肠道消化酶活力较低, 证明刺参对其消化吸收能力较弱。与此一致, 本研究中铜藻及海带渣组刺参肠道皱襞高度明显低于对照组及混合藻粉组, 细胞数目明显减少, 而肠绒毛的完整性及高度是营养物质被消化吸收的基本保障, 可能是因为消化道内褐藻酸酶活力较低(唐黎等, 2007), 刺参对铜藻和海带渣的吸收能力较弱, 绒毛之间的隐窝细胞分裂速度降低, 不能及时分化迁移, 补充正常脱落的绒毛上皮(王吉桥等, 2007; 孙丽娜, 2013), 消化吸收的表面积减少, 从而影响了对营养物质的吸收。此外, 酸不溶性灰分是指示饲料消化率的有效指标(Li *et al*, 2008), 本研究中, 海带、石莼及混合藻粉组的酸不溶性灰分均显著低于对照组, 铜藻显著高于对照组, 海带渣与对照组差异不显著, 表明刺参对海带、石莼及混合藻粉的消化吸收率较高, 对铜藻和海带渣的消化吸收率低, 可能因为较铜藻而言, 海带和石莼的质地较软, 易被刺参肠

道破坏。

T-SOD、ACP 和 AKP 是评价刺参机体免疫力的重要指标。T-SOD 是机体清除活性氧的关键防御酶, 其活性直接指示免疫系统的状态及清除自由基的能力(杨宁等, 2016; 秦搏等, 2015; 董晓亮等, 2013), MDA 是自由基作用于脂质发生过氧化的终产物, 会引起蛋白质、核酸等生物大分子交联聚合(Wakita *et al*, 2011)。在本研究中, 海带渣组刺参的氧化产物 MDA 含量显著高于其他各组, T-SOD 活性显著低于其他各组, 表明该组刺参体内脂质过氧化反应较为严重, 机体清除自由基的能力较弱, 混合藻粉组 T-SOD 活性与对照组差异不显著, 但均显著高于其他各组, 表明多种藻粉混合饲喂刺参可以有效提高机体清除自由基的能力, 提高刺参的抗氧化性能。ACP 和 AKP 是溶酶体酶的重要组成部分(郑慧等, 2014), 同时还是刺参体内参与免疫防御活动的重要水解酶, 在刺参抵抗疾病、免疫反应及细胞损伤修复过程中具有一定的生物学意义(李继业, 2007)。在本研究中, 海带、海带渣、石莼及混合藻粉组的刺参肠道 ACP 和 AKP 活性显著高于对照组和铜藻组, 可能是因为海带和石莼中含有较多微量元素及多糖成分, 能激活免疫相关酶活性, 从而有效提高刺参的免疫性能(李丹彤等, 2014)。研究证实, 刺参大部分的免疫反应都是由阿米巴吞噬细胞介导, Canicatti(1990)在刺参 *H. polii* 阿米巴吞噬细胞中发现 ACP、AKP、 β -葡萄糖苷酶、氨基多肽酶、酸性蛋白酶、碱性蛋白酶和脂酶等多种溶酶体酶, 同时在包裹体中也检测到了 ACP 活性。

4 结论

通过对刺参生长性能、非特异性免疫及消化机能的研究可知, 混合藻粉具有跟鼠尾藻相似的饲喂效果, 因此建议刺参幼参养殖中多种海藻粉混合使用, 以保证刺参营养均衡。

参 考 文 献

- Canicatti C. Lysosomal enzyme pattern in *Holothuria polii* coelomocytes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1990, 56(1): 70-74
- Cui LB, Dong ZN, Lu YH. Histological and histochemical studies on the digestive system of *Apostichopus japonicus*. *Chinese Journal of Zoology*, 2000, 35(6): 2-4 [崔龙波, 董志宁, 陆瑶华. 仿刺参消化系统的组织学和组织化学研究. *动物学杂志*, 2000, 35(6): 2-4]
- Dong XL, Li CL, Zhao B, *et al*. Effects of low salinity stress on the activities of non-specific immune enzymes and antibacterial activity of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(3): 82-87 [董晓亮, 李成林,

- 赵斌, 等. 低盐胁迫对刺参非特异性免疫酶活性及抗菌活性的影响. 渔业科学进展, 2013, 34(3): 82–87]
- Gao QF, Wang YS, Dong SL, *et al.* Absorption of different food sources by sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) (Echinodermata: Holothuroidea): Evidence from carbon stable isotope. *Aquaculture*, 2011, 319(1–2): 272–276
- Ge LB, Gao QF, Dong SL. Effects of different algae powders on the growth, body composition and digestive enzyme activity of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2017(1): 80–87 [葛立保, 高勤峰, 董双林. 不同藻粉对刺参生长、体成分和消化酶活性的影响. 海洋湖沼通报, 2017(1): 80–87]
- Hao JP. The research of *Apostichopus japonicus*' bait produced with kelp residue and brewers' graint. Master's Thesis of Harbin Institute of Technology, 2014, 1–56 [郝继浦. 利用海带渣和啤酒糟生产刺参饵料的研究. 哈尔滨工业大学硕士研究生学位论文, 2014, 1–56]
- Jiang LX, Yang N, Li J, *et al.* Effects of temperature and pH on the activities of digestive enzymes in *Apostichopus japonicus*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2007, 38(5): 476–480 [姜令绪, 杨宁, 李建, 等. 温度和 pH 对刺参 (*Apostichopus japonicus*) 消化酶活性的影响. 海洋与湖沼, 2007, 38(5): 476–480]
- Li DT, Fan YM, Chang YQ, *et al.* Effects of two lectins extracted solution from kelp *Laminaria japonica* Aresch and laver *Porphyra yezoensis* Veda on activities of immunoenzymes in body wall of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2014, 29(6): 607–612 [李丹彤, 范友敏, 常亚青, 等. 海带和条斑紫菜凝集素提取液对刺参体壁主要免疫酶活性的影响. 大连海洋大学学报, 2014, 29(6): 607–612]
- Li JY. The immunological characters and pathogenic study of cultured *Apostichopus japonicus*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2007, 1–96 [李继业. 养殖刺参免疫学特征与病害研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2007, 1–96]
- Li M, Liao MJ, Chang Q, *et al.* Effects of different diets containing *Enteromorpha prolifera* on growth, digestion and non-specific immunity of juvenile sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(5): 122–129 [李猛, 廖梅杰, 常青, 等. 不同浒苔型饲料对幼刺参 (*Apostichopus japonicus*) 生长、消化及非特异性免疫的影响. 渔业科学进展, 2017, 38(5): 122–129]
- Li P, Webb KA, Gatlin DM. Evaluation of acid-insoluble ash as an indicator for digestibility determination with red drum, *Sciaenops ocellatus*, and hybrid striped bass, *Morone chrysops* × *M. saxatilis*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2008, 39(1): 120–125
- Li X, Zhang SY, Chen SQ, *et al.* Effects of four feedstuffs on the growth, body composition and digestive physiology of *Apostichopus japonicus*. *Feed Industry*, 2013, 34(8): 36–40 [李旭, 章世元, 陈四清, 等. 四种饲料原料对刺参生长、体成分及消化生理的影响. 饲料工业, 2013, 34(8): 36–40]
- Liu CL, Wang YT, Qin B, *et al.* Analysis and evaluation of nutrient composition in the body wall of Penglai sea cucumber (*Apostichopus* sp.). *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(5): 111–118 [刘长琳, 王有廷, 秦搏, 等. 蓬莱玉参 (*Apostichopus* sp.) 体壁的营养成分分析及评价. 渔业科学进展, 2015, 36(5): 111–118]
- Qin B, Chang Q, Chen SQ, *et al.* Effects of dosage and treatments of *Enteromorpha prolifera* on growth, digestibility, digestive enzymes and non-specific immunity enzymes of juvenile sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka). *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(4): 547–556 [秦搏, 常青, 陈四清, 等. 饲料中浒苔添加量以及处理方法对幼刺参生长、消化率、消化酶和非特异性免疫酶的影响. 水产学报, 2015, 39(4): 547–556]
- Seo JY, Lee SM. Optimum dietary protein and lipid levels for growth of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Aquaculture Nutrition*, 2011, 17(2): 56–61
- Sun LN. Histocytological events and analysis of key genes during intestine regeneration in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). Doctoral Dissertation of University of Chinese Academy of Sciences, 2013, 1–132 [孙丽娜. 仿刺参 *Apostichopus japonicus* (Selenka) 消化道再生的组织细胞特征与关键基因分析. 中国科学院大学博士研究生学位论文, 2013, 1–132]
- Tang L, Wang JQ, Xu C, *et al.* Activities of four digestive enzymes in various developmental larvae and in alimentary canals at various sizes of *Apostichopus japonicus*. *Fisheries Science*, 2007, 26(5): 275–277 [唐黎, 王吉桥, 许重, 等. 不同发育期的幼体和不同规格刺参消化道中四种消化酶的活性. 水产科学, 2007, 26(5): 275–277]
- Tang W, Wang QJ, Zhang L, *et al.* Effects of different algae on immunity and body composition of juvenile sea cucumber. *Resource Development and Market*, 2014, 30(8): 905–907 [唐薇, 王庆吉, 张蕾, 等. 不同藻粉对刺参组织免疫性能和体壁成分的影响. 资源开发与市场, 2014, 30(8): 905–907]
- Wakita C, Honda K, Shibata T, *et al.* A method for detection of 4-hydroxy-2-nonenal adducts in proteins. *Free Radical Biology and Medicine*, 2011, 51(1): 1–4
- Wang JQ, Tang L, Xu C, *et al.* Histological observation of alimentary tract and annual changes of four digestive enzymes in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Fisheries Science*, 2007, 26(9): 481–484 [王吉桥, 唐黎, 许重, 等. 仿刺参消化道的组织学及其 4 种消化酶活性的周年变化. 水产科学, 2007, 26(9): 481–484]
- Wen B, Gao QF, Dong SL, *et al.* Effects of different feed ingredients on growth, fatty acid profiles, lipid peroxidation and aminotransferases activities of sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). *Aquaculture*, 2016, 454: 176–183
- Yang N, Guo ZS, Wang ZL. Effects of dietary green laver *Enteromorpha prolifera* on growth, activity of digestive enzymes and immunity in sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fisheries Science*, 2016, 35(5): 498–503 [杨宁, 郭中帅, 王正丽. 饲料中添加浒苔对仿刺参幼参生长、消化酶活性和免疫力的影响. 水产科学, 2016, 35(5): 498–503]
- Yuan XT, Yang HS, Zhou Y, *et al.* The influence of diets containing dried bivalve feces and/or powdered algae on growth and energy distribution in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) (Echinodermata: Holothuroidea). *Aquaculture*, 2006, 256(1): 457–467
- Yin XW, Li WX, Bai HF, *et al.* Effects of different seaweed diets on growth of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2015, 30(3): 276–280 [殷旭旺, 李文香, 白海锋, 等. 不同海藻饲料对刺参幼参生长的影响. 大连海洋大学学报, 2015, 30(3): 276–280]
- Zhang JJ, Duan R, Xu K, *et al.* Status and development of dealginate residues in kelp industry. *Fisheries Science*, 2010,

- 29(10): 620–623 [张俊杰, 段蕊, 许可, 等. 海带工业中海带渣应用的研究及展望. 水产科学, 2010, 29(10): 620–623]
- Zhao B, Hu W, Li CL, *et al.* The effects of low salinity on the growth and activities of digestive enzymes in sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(1): 91–96 [赵斌, 胡炜, 李成林, 等. 低盐环境对3种规格刺参(*Apostichopus japonicus*)幼参生长与消化酶活性的影响. 渔业科学进展, 2015, 36(1): 91–96]
- Zheng H, Li B, Rong XJ, *et al.* Effects of salinity and dissolved oxygen variation on the non-specific immune response of *Apostichopus japonicus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(1): 118–124 [郑慧, 李彬, 荣小军, 等. 盐度和溶解氧对刺参非特异性免疫酶活性的影响. 渔业科学进展, 2014, 35(1): 118–124]
- Zheng HY, Rao DZ, Chen GF, *et al.* Consideration on protective exploitation of *Sargassum horneri* (Turn.) Ag resource around Nanji Islands. *Modern Fisheries Information*, 2008, 23(10): 25–26 [郑海羽, 饶道专, 陈高峰, 等. 保护性开发南麂列岛铜藻 *Sargassum horneri*(Turn.)Ag. 资源的思考. 现代渔业信息, 2008, 23(10): 25–26]
- Zhu JX, Liu H, Leng KL, *et al.* Studies on the effects of some common diets on the growth of *Apostichopus japonicus*. *Marine Fisheries Research*, 2007, 28(5): 48–53 [朱建新, 刘慧, 冷凯良, 等. 几种常用饵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]

(编辑 陈辉)

Application Research of Five Seaweeds in Juvenile Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka)

WANG Xiaoyan, QIAO Hongjin, HUANG Bingshan,
WANG Chengqiang, LI Peiyu, LI Baoshan, WANG Jiying^①

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

Abstract In order to evaluate the application of *Sargassum thunbergii*, *Sargassum horneri*, *Saccharina japonica*, degummed kelp, *Ulva lactuca* L., and their mixture in juvenile sea cucumbers [(10.02±0.03) g], an 8-week-long experiment was conducted in a circulating water system. Growth performance, body composition, intestinal digestive enzyme activities, and nonspecific immune performance were analyzed. Results showed that the weight gain rate (WGR) and specific growth rate (SGR) of sea cucumbers fed *S. thunbergii* and the seaweed mixture were significantly higher than those of other groups ($P<0.01$), and were the lowest in sea cucumbers fed degummed kelp. Sea cucumbers fed degummed kelp had significantly lower ratio of intestine weight to body weight (IBR) and ratio of viserosomatic weight to body weight (VBR) than those of the other groups ($P<0.05$). Different seaweed did not significantly affect survival rate ($P>0.05$). Body wall moisture, crude ash, crude protein, and the crude fat of sea cucumbers were not significantly affected by the seaweeds ($P>0.05$). The intestinal trypsin activities in sea cucumbers fed *S. thunbergii*, and the seaweed mixture were significantly higher than those in the kelp, degummed kelp, and *Ulva* groups, and were the lowest for degummed kelp ($P<0.01$). The different seaweeds had no significant effect on alpha amylase and lipase activity ($P>0.05$), but significant effects were observed in the hydrochloric acid-insoluble ash of fecal matter ($P<0.01$). Intestinal total-superoxide dismutase (T-SOD), acid phosphatase (ACP), and alkaline phosphatase (AKP) activities in the sea cucumbers fed *S. thunbergii* and seaweed mixture were significantly higher than those in the other groups ($P<0.01$). Intestinal malondialdehyde (MDA) content in sea cucumbers fed degummed kelp was significantly higher than that in the other groups ($P<0.01$). In conclusion, a comprehensive consideration of growth performance and nonspecific immune performance indicated that the four seaweeds individually cannot achieve the feeding effect of replacing dietary *S. thunbergii*; however, using mixed seaweeds can achieve an effect similar to *S. thunbergii* under these experimental conditions.

Key words *Apostichopus japonicus*; *Sargassum thunbergii*; Seaweed; Growth performance; Digestive enzyme; Nonspecific immune performance

① Corresponding author: WANG Jiying, E-mail: ytwjy@126.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180320001

http://www.ykxjz.cn/

袁艳敏, 刘福利, 梁洲瑞, 汪文俊, 孙修涛. 不同光质及胁迫处理对鼠尾藻及附生藻类光合生理的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(3): 168-177

Yuan YM, Liu FL, Liang ZR, Wang WJ, Sun XT. Effects of different light quality and stress treatments on photosynthetic efficiencies and physiological characteristics of *Sargassum thunbergii* and epiphyllous algae. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(3): 168-177

不同光质及胁迫处理对鼠尾藻及 附生藻类光合生理的影响*



袁艳敏^{1,2} 刘福利^{2,3①} 梁洲瑞^{2,3} 汪文俊^{2,3} 孙修涛²

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室
海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

摘要 利用鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*)、菱形藻(*Nitzschia*)、石莼(*Ulva pertusa*)和绢丝藻(*Callithamnion corymbosum*)作为研究对象,通过白光、蓝光、红光照射,1%硝酸铵、1%柠檬酸、3%硫酸铵处理不同时间,淡水浸泡不同时间 3 种杂藻清除方法,系统研究光质、药物和淡水处理对鼠尾藻及杂藻光合生理的影响。结果显示,对于相对生长速率(RGR)、表观光合速率(P_n)及表观光合速率与呼吸耗氧速率(R)的比(P_n/R),鼠尾藻幼孢子体在蓝光下均明显大于在白光和红光下,而菱形藻则在红光下较大,且鼠尾藻幼孢子体与菱形藻在蓝光下的 P_n 比明显大于其在白光和红光下的 P_n 比。结果显示,鼠尾藻幼孢子体若与菱形藻进行竞争,在蓝光下相对于在白光和红光下更有优势。硝酸铵、硫酸铵、柠檬酸药物处理对鼠尾藻幼孢子体的生理状态有一定的影响,且这种伤害具有不可逆性;对鼠尾藻嫩芽的伤害较小,且可恢复正常;对石莼的清除效果不明显,对绢丝藻有伤害。淡水处理对鼠尾藻幼孢子体有伤害,对鼠尾藻嫩芽伤害较小,对石莼影响不大,对绢丝藻有伤害。研究表明,在鼠尾藻幼苗早期培育过程中,可增大蓝光的照射或减少红光的照射,在一定程度上能促进鼠尾藻的生长且抑制菱形藻的生长;在鼠尾藻早期幼苗的杂藻清除中,应避免使用 1%硝酸铵、1%柠檬酸和 3%硫酸铵处理,会对鼠尾藻幼孢子体产生伤害;鼠尾藻育苗早期不宜使用淡水浸泡除去杂藻,鼠尾藻嫩芽每次淡水浸泡 30 min,可清除杂藻,且对藻体无伤害。

关键词 鼠尾藻; 杂藻; 光质; 药物处理; 淡水处理

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)03-0168-10

鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*)是北太平洋西部特
有的暖温性海藻,在我国北起辽东半岛,南至雷州半

岛的硃洲岛均有广泛分布,是某些海域潮间带的优势
藻种(曾呈奎, 1962)。鼠尾藻在食品、工业、医药、

* 国家重点研发计划(2018YFD0900305)、现代农业产业技术体系藻类体系离岸式养殖岗位专项(CARS-50)和青岛市民生科技计划项目(17-3-3-65-nsh)共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2018YFD0900305), China Agriculture Research System (CARS-50), and Qingdao Science and Technology Project (17-3-3-65-nsh)]. 袁艳敏, E-mail: yuanyym2991@163.com

① 通讯作者: 刘福利, 副研究员, E-mail: liufl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-03-20, 收修改稿日期: 2018-04-25

饲料(饵料)、环保等方面都具有特殊的价值,如鼠尾藻是海参(*Apostichopus japonicus*)的优质饲料,是提取褐藻胶、甘露醇、碘等的重要工业原料,还是降低海区富营养化、净化重金属污染海区的优质藻种等(包杰等,2008;韩晓弟等,2005;刘朝阳等,2006;张尔贤等,1995;郑怡,1994;魏玉西等,2002)。

近年来,对鼠尾藻的研究越来越深入和完善,鼠尾藻的人工养殖技术不断成熟(王飞久等,2006;李美真等,2009;孙修涛等,2010;陈洁等,2016)。但在海藻的人工育苗过程中,杂藻附着是很突出的问题,鼠尾藻育苗时期最主要的是附着硅藻的侵害,其他的附着杂藻主要是绿藻和红藻类(李美真等,2009),如刚毛藻(*Chladophora*)、浒苔(*Enteromorpha*)、水云、石莼(*Ulva pertusa*)和仙菜等,常用的除杂藻方法有洗刷苗帘、药浴(柠檬酸、硫酸铵、硝酸铵溶液)和淡水浸泡苗帘、干露等(贾桎等,2012;李美真等,2009;李生尧等,2009),但这些药物处理均对海藻幼苗产生一定程度的伤害。药物处理和淡水浸泡能有效去除杂藻,但在鼠尾藻幼孢子体时期,使用这些药物和淡水处理对种苗是否有影响还未知。本研究以山东青岛太平湾海区自然生长的鼠尾藻为材料,以此海区常见的石莼和绢丝藻(*Callithamnion corymbosum*)为绿藻和红藻类杂藻的代表藻,探究以淡水配制的1%柠檬酸、1%硝酸铵、3%硫酸铵溶液和淡水分别处理不同时间,是否能有效去除杂藻,又能保证鼠尾藻苗种的健康生长。

光是调控植物生长发育的关键生态因子之一,藻类对可见光的吸收波长主要集中在400~510 nm的蓝紫光区和610~720 nm的红橙光区(韩军军等,2017)。汪文俊等(2009)研究发现,蓝光始终促进海带(*Laminaria japonica*)幼孢子体的生长,在红光下藻体生长极为缓慢。赵凤娟(2007)研究表明,相同光强条件下的蓝光和白光相比较,蓝光不能满足鼠尾藻幼苗早期生长的需要。Kim等(2015)研究发现,日光灯、红光、绿光下生长的红藻龙须菜(*Gracilaria tikvahiae*)具有较高的生长速率。而不同光质对鼠尾藻的光合和生长的影响还未知。本研究以白光为对照,探究蓝光、红光分别对鼠尾藻生长和光合生理的影响。

本研究利用不同光质、不同药物浓度和淡水对鼠尾藻幼苗及其附着杂藻进行处理,采用叶绿素荧光和液相氧电极技术,揭示了鼠尾藻和杂藻在不同处理时光合生理的变化与异同,探究鼠尾藻人工育苗过程中,适宜的光质培养条件及幼苗期间有效的杂藻清除方法,旨在进一步完善鼠尾藻人工育苗技术,为鼠尾藻的大规模养殖提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究于2017年6月20日在山东青岛太平角潮间带礁石区,采集健康、近成熟的雌雄鼠尾藻,在野外进行简单清洗,然后带回实验室,用过滤消毒的海水彻底清洗,在显微镜下检查生殖托的成熟情况。低温室中(14℃左右)培养,培养液为灭菌海水,营养盐为NaNO₃-N:4 mg/L, KH₂PO₄-P:0.4 mg/L,放置适量比例雌雄生殖托(雌:雄=3:1),下层铺灭菌玻璃片用于受精卵的附着和收集。采样第2天即排卵和精子,2~3 d后取出藻体,海水中的游离幼孢子体充气悬浮培养,玻璃片上的幼孢子体按下面的方法进行实验。本研究所使用的鼠尾藻幼孢子体大小均在0.5 cm以下。

将附着在鼠尾藻玻璃片上的菱形藻(*Nitzschia*)刮下后悬浮培养,培养条件与鼠尾藻相同。

叶绿素荧光实验的鼠尾藻嫩芽(梁洲瑞等,2011)、石莼和绢丝藻样品于2017年9月11日在青岛太平角潮间带礁石区采集,藻体生长状态良好。

1.2 实验方法

将实验材料置于GXZ智能型光照培养箱(宁波江南仪器厂)中培养,培养液为灭菌海水,营养盐为NaNO₃-N:4 mg/L, KH₂PO₄-P:0.4 mg/L,光强为60 μmol photons/(m²·s),温度为18℃,每3 d换水1次,使用Oxygraph液相氧电极测定表观光合速率(P_n)和呼吸耗氧速率(R),叶绿素荧光成像系统(IMAGING-PAM)测定光系统II(PS II)的最大荧光产量 F_v/F_m 。测定方法:样品暗处理30 min后测定 F_v/F_m 。每个处理组设置3个重复。

1.2.1 光质对鼠尾藻幼孢子体光合生理、相对生长速率及菱形藻光合生理的影响 取出藻体后,将附着在玻璃片上的鼠尾藻幼孢子体分为3组,共9个玻璃片,每个玻璃片在显微镜(Nikon E200,日本)下随机选取约50个鼠尾藻幼孢子体拍照记录。用1 L的烧杯分别放在以白光(色温为5000~7000 K)、蓝光(波长为460~475 nm)、红光(波长为620~635 nm)LED灯为光源的光照培养箱中培养,7 d后再次在显微镜下拍照。采用Image-Pro Plus 5.1图像分析软件,对实验所拍照片进行分析,测量鼠尾藻幼孢子体的长度。幼孢子体相对生长速率(Relative growth rate, RGR)计算公式:

$$RGR=100 \times (\ln L_2 - \ln L_1) / t$$

式中, L_1 、 L_2 分别为培养前后幼孢子体的长度,

t 为培养时间。

悬浮充气培养的鼠尾藻幼孢子体在不同光质的光照培养箱中适应 3 d, 分别在对应光质下测定 P_n 和 R 。

将菱形藻按照同样的方法测出不同光质下的 P_n 和 R 。

1.2.2 不同药物浓度对鼠尾藻及杂藻光合生理的影响

将鼠尾藻幼孢子体(长度为 0.5 cm 以下)及鼠尾藻新生嫩芽分别在淡水配制 1% 柠檬酸(pH=2.27)中浸泡 1、3、5 min, 在淡水配制 1% 硝酸铵(pH=5.96)中浸泡 3、5、10 min, 在淡水配制 3% 硫酸铵(pH=5.88)中浸泡 3、5、10 min, 浸泡后, 马上用海水冲洗 5 min, 测定浸泡处理后, 在对照条件下恢复培养 2、24 h 后的 P_n 和 R 。

用相同的药物处理方法处理鼠尾藻幼孢子体、石莼和绢丝藻, 测定浸泡处理后, 在对照条件下恢复培养 1 d 或 1、3 d 后的 F_v/F_m 。

1.2.3 淡水不同时间对鼠尾藻及杂藻光合生理的影响

将鼠尾藻幼孢子体、鼠尾藻新生嫩芽、石莼及绢丝藻分别在淡水中浸泡 30 min、1 h, 测定浸泡处理后, 在对照条件下恢复培养 1、3 d 后的 F_v/F_m 。

1.3 数据分析

数据分析与作图采用 Excel 软件, 用 T 检验进行显著性差异分析($P < 0.05$ 为显著差异)。

2 结果

2.1 光质对鼠尾藻幼孢子体光合生理、相对生长速率及菱形藻光合生理的影响

从图 1a 可以看出, 在不同光质培育 7 d 后, 鼠尾藻幼孢子体的 P_n 在蓝光下最大, 白光下次之, 红光下最小。其中, 幼孢子体在蓝光下的 P_n 明显大于白光和红光下($P < 0.05$), 而白光与红光间无显著差异($P > 0.05$)。幼孢子体的 R 在白光下最大, 红光下最小, 其中, 白光和蓝光明显大于红光($P < 0.05$), 而白光与蓝光间无显著差异($P > 0.05$)。从图 1b 可以看出, 在不同光质培育 7 d 后, 菱形藻的 P_n 在红光下最大, 蓝光次之, 白光下最小。菱形藻在红光下的 P_n 明显大于白光和蓝光($P < 0.05$), 白光与蓝光间无显著差异($P > 0.05$)。菱形藻的 R 在蓝光下最大, 白光下最小, 蓝光明显大于白光($P < 0.05$), 其他无显著差异($P > 0.05$)。

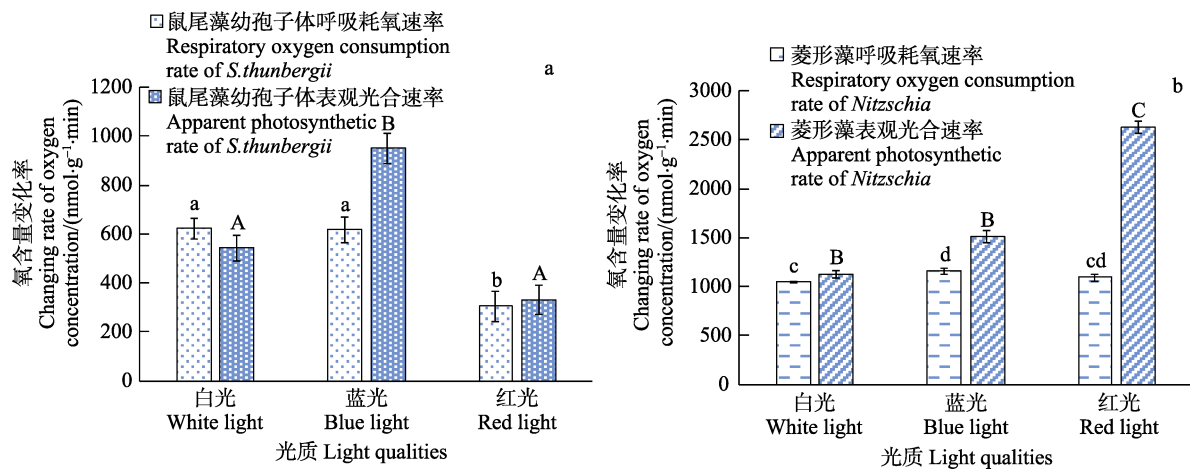


图 1 不同光质下培育 7 d 后鼠尾藻、菱形藻 P_n 和 R 的影响

Fig.1 Apparent photosynthetic rate and respiratory oxygen consumption rate of *S. thunbergii* and *Nitzschia* after cultured in white, blue and red light for 7 days

图中不同字母为差异显著, 相同字母为差异不显著。小写字母为呼吸速率差异, 大写字母为表观光合速率差异
Different letters in the diagram indicate significant differences, and the same letters indicate no significant differences.
Lowercase letters represent respiration rate, and capital letters represent photosynthetic rate

从图 2a 可以看出, 在白光、蓝光和红光下鼠尾藻与菱形藻 P_n 比值均小于 1, 其中, 蓝光下最大, 白光次之, 红光下最小, 各组间均有显著差异($P < 0.05$)。从图 2b 可以看出, 在不同光质下, 鼠尾藻 P_n/R 值蓝光下最大, 白光下最小。其中, 蓝光下 P_n/R 值显著大于白光和红光($P < 0.05$), 白光与红光间无显著差异($P > 0.05$)。

鼠尾藻幼孢子体在蓝光下 P_n/R 最大, 即光合活性最大, 蓝光适宜鼠尾藻幼孢子体的生长。从图 2c 可以看出, 不同光质下, 菱形藻的 P_n/R 值红光下最大, 白光下最小。方差分析结果显示, 白光、蓝光和红光 3 个处理组间均差异显著($P < 0.05$)。菱形藻在红光下 P_n/R 值最大, 即光合活性最大, 红光适宜菱形藻的生长。

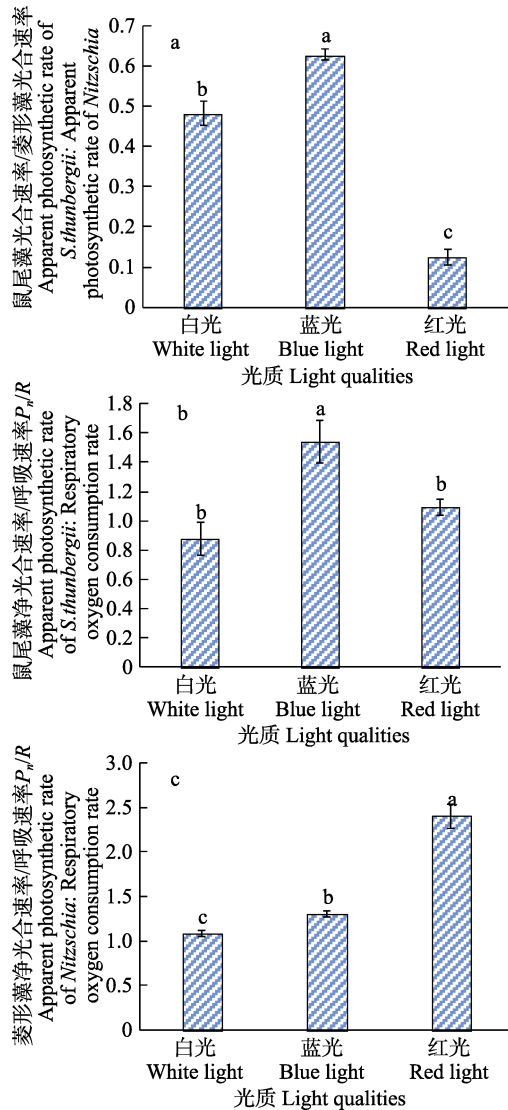


图 2 不同光质对鼠尾藻 P_n /菱形藻 P_n 、鼠尾藻 P_n/R 、菱形藻 P_n/R 的影响

Fig.2 The ratio of apparent photosynthetic rate of *S. thunbergii*, and *Nitzschia*, the ratio of apparent photosynthetic rate and respiratory oxygen consumption rate of *S. thunbergii* and *Nitzschia*

图中不同字母为差异显著, 相同字母为差异不显著, 下同
Different letters in the diagram indicate significant difference, and the same letters indicate no significant difference, the same as below

从图 3 可以看出, 不同光质条件下, 培育 7 d 后, 鼠尾藻幼孢子体的 RGR 蓝光下最大, 为 18.08%, 红光下最小, 为 17.17%。方差分析结果显示, 3 个处理组间无显著差异 ($P>0.05$)。

2.2 不同药物浓度对鼠尾藻及杂藻光合生理的影响

1%硝酸铵 (pH=5.96) 处理鼠尾藻幼孢子体后, 对应时间的 P_n 、 R 和总光合速率 (呼吸速率和光合速率

的总和) 见表 1。从表 1 可以看出, 处理 3 min 组随着恢复时间的延长, 幼孢子体的 P_n 逐渐降低, R 逐渐升高, 总光合速率逐渐升高, 与对照组相比无显著差异 ($P>0.05$)。处理 5、10 min 组随着恢复时间的延长, 鼠尾藻的 P_n 、 R 和总光合速率都逐渐降低。5 min 后, 随着恢复时间延长, P_n 和 R 逐渐下降, 药物处理可能对鼠尾藻幼孢子体造成了不可逆的损伤, 超过了其恢复的极限, 时间越久越趋于死亡。

表 2 为 3%硫酸铵 (pH=5.88) 处理鼠尾藻幼孢子体后, 对应时间的 P_n 、 R 和总光合速率。恢复 2 h 和恢复 24 h 的 P_n 、 R 和总光合速率均未恢复正常水平, 且处理 3、5、10 min 组恢复 24 h 的 P_n 、 R 和总光合速率均分别低于其恢复 2 h 的, 3%硫酸铵比 1%硝酸铵酸性稍强, 3%硫酸铵药物处理可能也对鼠尾藻幼孢子体造成了不可逆的损伤, 时间越久越趋于死亡。

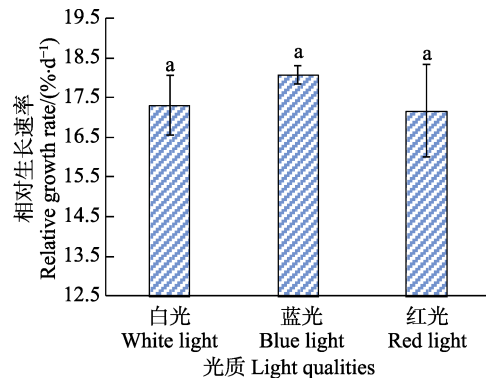


图 3 不同光质条件下培育 7 d 后鼠尾藻幼孢子体的 RGR
Fig 3 Relative growth rate of the young sporophytes after cultured in white, blue and red light for 7 days

1%柠檬酸 (pH=2.27) 处理鼠尾藻幼孢子体后, 对应时间的 P_n 、 R 和总光合速率见表 3。从表 3 可以看出, 1%柠檬酸处理对鼠尾藻幼孢子体有较大伤害, 且时间越长伤害越大。处理 1、3、5 min 组恢复 2、24 h 时, P_n 均为负值, R 随着处理时间的增加逐渐降低, 随着恢复时间的增加逐渐升高, 但仍远远低于对照组, 不能恢复到正常水平。相对于硫酸铵和硝酸铵, 柠檬酸对鼠尾藻幼孢子体的伤害更大。

图 4 为 1%硝酸铵、3%硫酸铵组处理鼠尾藻幼孢子体后, 各对应时间的 F_v/F_m 。从图 4a 可以看出, 1%硝酸铵处理 3、5 min 和 3%硫酸铵处理 3 min 并在恢复 1、3 d 后, F_v/F_m 均显著低于对照组 ($P<0.05$), 各组处理后, 恢复 1、3 d 之间均无显著差异 ($P>0.05$)。恢复 3 d 后的鼠尾藻 F_v/F_m 值均小于 0.6, 鼠尾藻不能恢复到正常水平。从图 4b 可以看出, 硝酸铵、硫酸铵处理组对鼠尾藻嫩芽影响较小, 1 d 后均可恢复正常

水平,1%硝酸铵处理 3、5 min 和 3%硫酸铵处理 3 min 后, F_v/F_m 均显著低于对照组($P<0.05$), 各处理组恢复 1 d 后, F_v/F_m 与对照组均无显著差异($P>0.05$), 其中, 1%硝酸铵 5 min、3%硫酸铵 3 min 组处理后, F_v/F_m 均显著低于恢复 1 d 的 F_v/F_m ($P<0.05$), 3%硝酸铵处理 3 min 后, 与恢复 1 d 组间无显著差异($P>0.05$)。

从图 5a 可以看出, 1%硝酸铵和 3%硫酸铵处理对石莼的影响不同。1%硝酸铵药物处理时间越长, 石莼的 F_v/F_m 越低, 1%硝酸铵处理 5 min 恢复 1 d 后, F_v/F_m 显著低于对照组($P<0.05$), 其他无显著差异($P>0.05$)。3%硫酸铵处理对石莼影响较小, 各组间无

显著差异($P>0.05$)。从图 5b 可以看出, 1%硝酸铵、3%硫酸铵药物处理对绢丝藻 F_v/F_m 的影响显著不同。1%硝酸铵处理 3、5 min, 各组 F_v/F_m 显著低于对照组($P<0.05$), 其中, 处理 3 min 后恢复 1 d 时, F_v/F_m 显著低于 3 min 其他时间($P<0.05$), 其他无显著性差异($P>0.05$)。3%硫酸铵浸泡 3 min, 对绢丝藻 F_v/F_m 的影响不明显($P>0.05$)。

2.3 淡水不同时间对鼠尾藻及杂藻光合生理的影响

从图 6a 可以看出, 淡水处理对鼠尾藻幼孢子体的 F_v/F_m 有显著影响。淡水处理 30 min、1 h 后, 各

表 1 1%硝酸铵处理不同时间对鼠尾藻幼孢子体 P_n 和 R 的影响

Tab.1 Apparent photosynthetic rate and respiratory oxygen consumption rate of *S. thunbergii* young sporophytes after 1% ammonium nitrate treatment (nmol/g·min)

用药时间 Time (min)	恢复正常条件下培养 2 h Restore 2 h			恢复正常条件下培养 24 h Restore 24 h		
	表观光合速率 P_n	呼吸耗氧速率 R	总光合速率 Total photosynthetic rate	表观光合速率 P_n	呼吸耗氧速率 R	总光合速率 Total photosynthetic rate
0	635	872	1507	730	828	1558
3	610	893	1502	591	981	1572
5	564	973	1537	166	326	492
10	349	872	1221	69	400	469

表 2 3%硫酸铵处理不同时间对鼠尾藻幼孢子体 P_n 和 R 的影响

Tab.2 Apparent photosynthetic rate and respiratory oxygen consumption rate of *S. thunbergii* young sporophytes after 3% ammonium sulfate treatment (nmol/g·min)

用药时间 Time (min)	恢复正常条件下培养 2 h Restore 2 h			恢复正常条件下培养 24 h Restore 24 h		
	表观光合速率 P_n	呼吸耗氧速率 R	总光合速率 Total photosynthetic rate	表观光合速率 P_n	呼吸耗氧速率 R	总光合速率 Total photosynthetic rate
0	635	872	1507	730	828	1558
3	428	888	1316	52	403	454
5	385	884	1269	-79	218	139
10	142	774	916	107	159	266

表 3 1%柠檬酸处理不同时间对鼠尾藻幼孢子体 P_n 和 R 的影响

Tab.3 Apparent photosynthetic rate and respiratory oxygen consumption rate of *S. thunbergii* young sporophytes after 1% citric acid treatment(nmol/g·min)

用药时间 Time(min)	恢复正常条件下培养 2 h Restore 2 h			恢复正常条件下培养 24 h Restore 24 h		
	表观光合速率 P_n	呼吸耗氧速率 R	总光合速率 Total photosynthetic rate	表观光合速率 P_n	呼吸耗氧速率 R	总光合速率 Total photosynthetic rate
0	635	872	1507	730	828	1558
1	-105	299	194	-34	614	580
3	-98	185	88	-174	376	202
5	-158	137	-21	-385	437	52

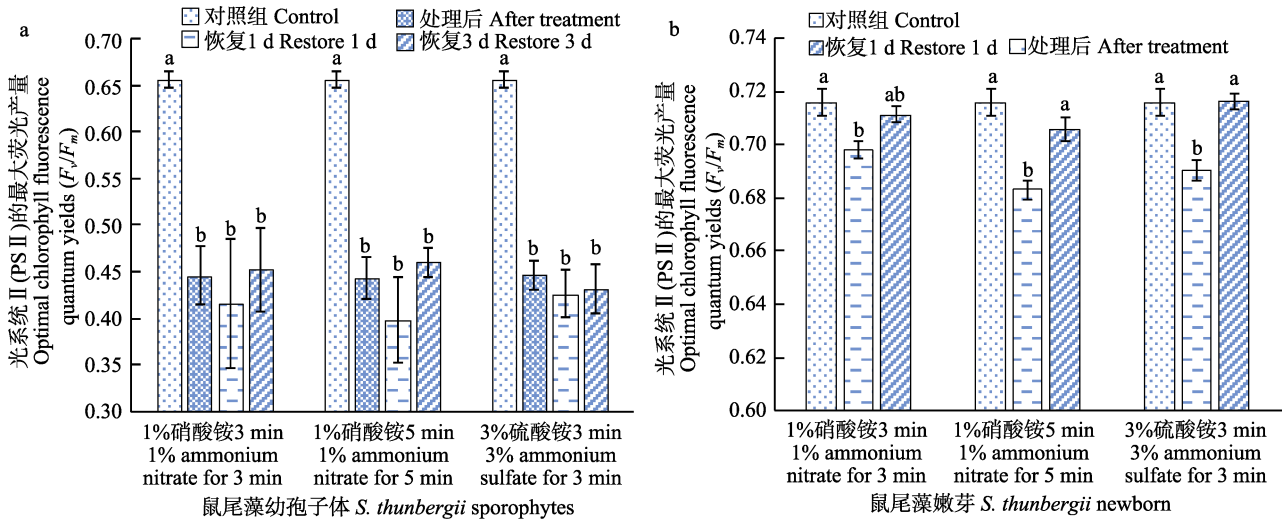


图 4 不同药物处理对鼠尾藻幼孢子体、鼠尾藻嫩芽 F_v/F_m 的影响

Fig.4 The optimal chlorophyll fluorescence quantum yields (F_v/F_m) of *S. thunbergii* young sporophytes and newborn branches after different medicine treatment

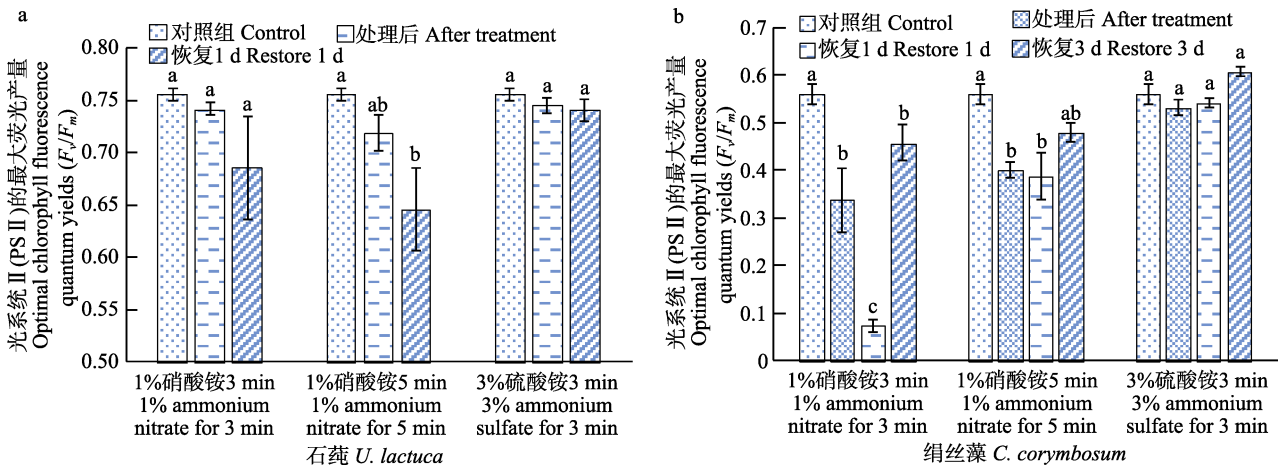


图 5 不同药物处理对石莼、绢丝藻 F_v/F_m 的影响

Fig.5 The optimal chlorophyll fluorescence quantum yields (F_v/F_m) of *U. lactuca* and *C. corymbosum* after different medicine treatment

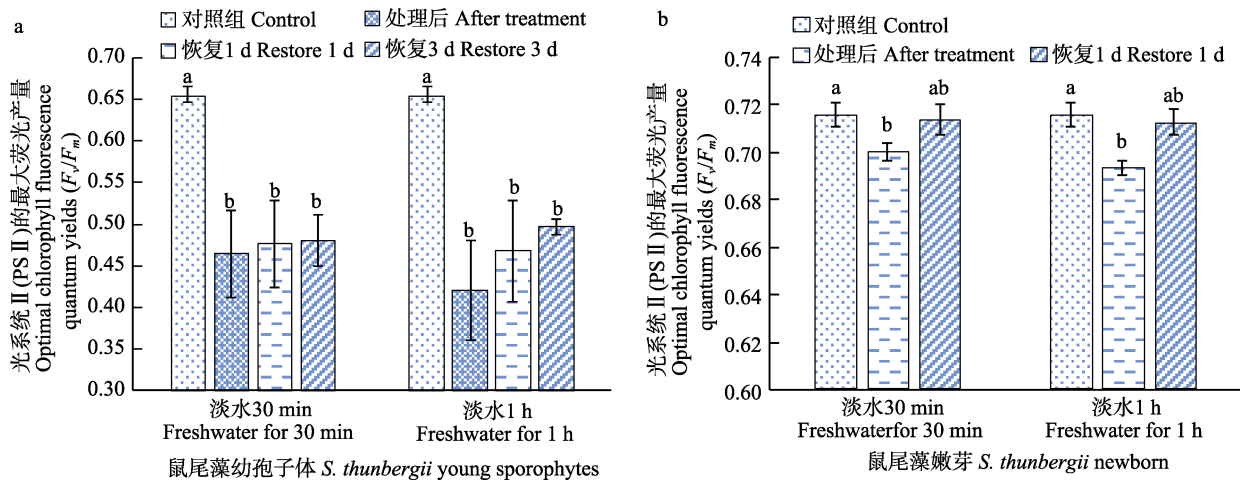


图 6 淡水处理不同时间对鼠尾藻幼孢子体、鼠尾藻嫩芽 F_v/F_m 的影响

Fig.6 The optimal chlorophyll fluorescence quantum yields (F_v/F_m) of *S. thunbergii* young sporophytes and newborn branches after fresh water treatment

组 F_v/F_m 显著低于对照组 ($P < 0.05$), 但处理后与恢复 1、3 d 各组间均无显著差异 ($P > 0.05$), 淡水处理对鼠尾藻幼孢子体有一定的伤害, 不易恢复。由图 6b 可以看出, 淡水处理 30 min、1 h 后, 鼠尾藻嫩芽 F_v/F_m 显著低于对照组 ($P < 0.05$), 其他无显著差异 ($P > 0.05$), 淡水处理对鼠尾藻嫩芽影响较小, 且 1 d 后可恢复正常。

淡水处理对石莼 F_v/F_m 的影响见图 7a。从图 7a 可以看出, 淡水处理 30 min、1 h 对石莼 F_v/F_m 的影

响不太明显。淡水 30 min 恢复 1 d 的 F_v/F_m 显著低于对照组 ($P < 0.05$), 可能是取样点误差。淡水处理 30 min 与对照组及处理 1 h 各组间与对照组均无显著差异 ($P > 0.05$)。从图 7b 可以看出, 淡水处理时间越长, 绢丝藻的 F_v/F_m 越小, 恢复时间越长, 绢丝藻 F_v/F_m 逐渐变大, 藻体逐渐恢复。淡水 30 min、1 h 处理后和恢复 1 d 的 F_v/F_m 均显著低于对照组和恢复 3 d 组 ($P < 0.05$), 恢复 3 d 与对照组间无显著差异 ($P > 0.05$)。

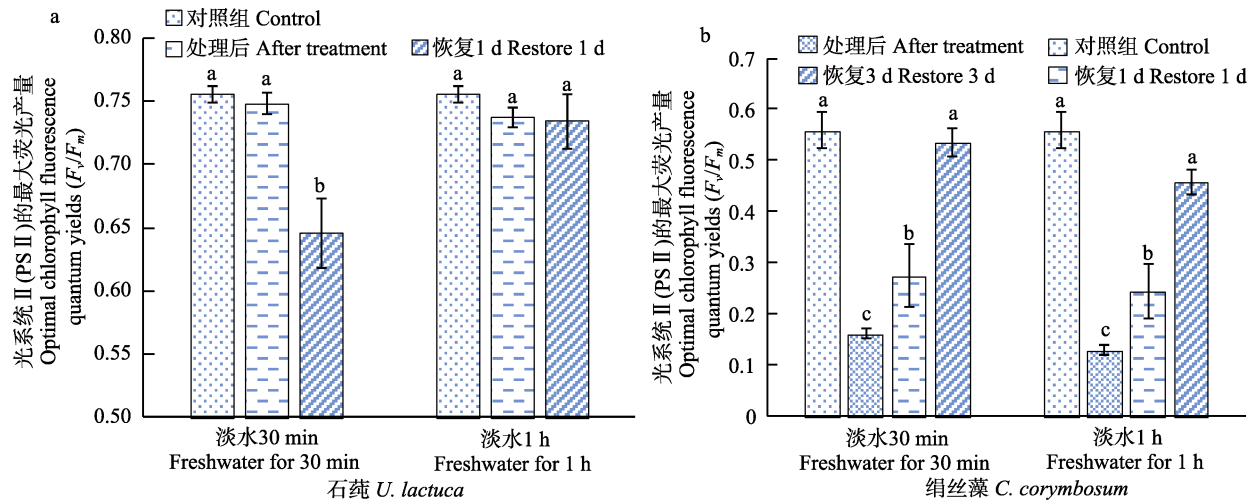


图 7 淡水处理不同时间对石莼、绢丝藻 F_v/F_m 的影响

Fig.7 The optimal chlorophyll fluorescence quantum yields (F_v/F_m) of *U. lactuca* and *C. corymbosum* after fresh water treatment

3 讨论

3.1 光质对鼠尾藻幼孢子体光合生理、相对生长速率及硅藻光合生理的影响

净光合放氧速率与净呼吸耗氧速率的比 (P_n/R) 是衡量细胞内物质积累的一个重要参数, 它受众多因素影响, 如细胞生长状态、营养环境等, P_n/R 值越高, 说明光合作用活性越高 (王超等, 2008)。在变化的生长环境中, 不同物种光合作用比值以及个体本身光合作用与呼吸作用比值, 对衡量物种新陈代谢具有重要的参考意义 (Humphrey, 1975)。光质对鼠尾藻幼孢子体生长的影响已有报道, 赵凤娟 (2007)、赵自国 (2008) 研究表明, 在蓝光条件下, 幼苗的生长速度显著低于在相同光强白光条件下的幼苗生长速度, 蓝光不能满足鼠尾藻幼苗早期生长的需要。但本研究中, 鼠尾藻幼孢子体在蓝光照射下, 生长速率和光合速率均高于白光, 且鼠尾藻幼孢子体的 P_n/R 在蓝光下最大, 即其在蓝光下光合活性最大。汪文俊等 (2009) 研究发现, 蓝光可作为一种能量来源, 从而直接影响光能吸收和

传递过程, 褐藻的主要捕光色素为叶绿素 *a* 和岩藻黄素, 岩藻黄素的吸收峰恰位于蓝光区, 可高效吸收利用蓝光。因此, 当照射光中蓝光的比例增加时, 其光合活性明显增大。对于蓝光对鼠尾藻生长发育的影响及其机制, 还需进一步的研究。

硅藻是微藻的一种, 在地球上分布广泛, 硅藻污染是藻类配子体及幼苗早期培育过程中经常遇到的问题, 硅藻与配子体争夺营养、光照、附着基等生长因素, 从而限制和影响配子体的生长发育。庄树宏等 (1999、2001) 研究发现, 红光能高效激活硅藻叶绿素分子从而加速光合速率, 而蓝光对硅藻细胞的生长具有抑制和伤害作用。本研究中, 菱形藻在红光下的光合速率和 P_n/R 值明显高于白光和蓝光, 但蓝光和白光无显著差异, 红光下硅藻的光合活性最大, 红光对硅藻叶绿素分子的激活作用效果明显。不同光质下, 鼠尾藻硅藻光合速率 P_n 的比值在蓝光下最大, 显著大于红光。综上所述, 在鼠尾藻的培育过程中, 增大蓝光的照射或减少红光的照射, 在一定程度上能促进鼠尾藻的生长且抑制硅藻的生长。

3.2 不同药物浓度对鼠尾藻及杂藻光合生理的影响

杂藻附着是鼠尾藻早期幼苗培育过程中常见问题, 杂藻往往拥有比苗种更广的环境适应范围, 杂藻大范围的覆盖苗帘, 会使刚下海的幼苗大量脱苗、窒息死亡, 导致人工育苗失败(李美真等, 2009)。本研究发现, 1%硝酸铵 3 min 处理组对鼠尾藻幼孢子体光合和呼吸作用几乎无影响, 而 1%硝酸铵处理 5、10 min、3%硫酸铵、1%柠檬酸处理后, 鼠尾藻幼孢子体的光合作用和呼吸作用均显著受到影响, 可能对鼠尾藻幼孢子体产生了不可逆的损伤, 超出了其恢复极限, 且时间越长, 伤害越大。叶绿素荧光实验中, 药物处理抑制了鼠尾藻幼孢子体 PS II 的活性, 对其光合作用产生了不可恢复的损害; 对鼠尾藻嫩芽的影响较小, 且一定时间后可恢复正常; 对石莼和绢丝藻也有伤害, 且随着时间延长, 伤害越大。1%硝酸铵、3%硫酸铵和 1%柠檬酸处理分别对鼠尾藻、石莼、绢丝藻的光合生理产生了不同的抑制作用, 可能是由药物酸碱度不同、不同藻类细胞壁和细胞膜对酸的透性不同引起的。海藻的细胞壁外层成分主要是纤维素, 内侧主要是细胞膜, 不同藻类中成分不完全一致, 对酸的透性也不一样; 且细胞内的代谢活动主要是由蛋白质组成的各种酶的酶促反应引起的, 酸透过细胞壁和细胞膜进入细胞内, 对酶的活性产生降低或失效的影响, 从而影响藻类的代谢活动, 对藻的光合生理产生影响(赵焕登等, 1987)。

液相氧电极和叶绿素荧光实验均表明, 1%柠檬酸、1%硝酸铵、3%硫酸铵药物处理能对鼠尾藻幼孢子体和绢丝藻等杂藻产生不可逆的伤害, 而对鼠尾藻嫩芽影响较小, 因此, 在鼠尾藻早期幼苗的杂藻清除中, 应避免使用这些药物。

3.3 淡水浸泡处理对鼠尾藻幼孢子体及杂藻的光合生理的影响

李美真等(2009)研究表明, 淡水浸泡 1 h, 鼠尾藻苗帘可有效除去多管藻、三叉仙菜(*Ceramium kondoi*)等红藻类杂藻。陈洁等(2015)研究发现, 淡水浸浴法去除污损藻类的效果因种而异, 需要根据污损藻类的种类而定, 对于三叉仙菜, 1 h 淡水浸浴可 100%去除, 同时不会损伤鼠尾藻藻体。刘启顺等(2006)研究表明, 淡水浸泡苗帘, 每次 30 min, 可清除杂藻, 对鼠尾藻的幼苗无伤害。本研究结果为淡水浸泡对鼠尾藻幼孢子体有伤害, 对鼠尾藻嫩芽的影响很小, 可能是因为鼠尾藻幼孢子体生理机能未完全成熟, 承受淡水浸泡的能力还比较弱, 随着鼠尾藻幼苗的长大,

其承受淡水浸泡的能力逐渐变强。淡水 30 min、1 h 对石莼影响较小, 对绢丝藻有较大影响, 且在 3 d 后有所恢复, 需及时冲洗。鼠尾藻育苗早期不宜使用淡水浸泡除去杂藻, 待鼠尾藻长大一些后, 每次淡水浸泡 30 min, 可清除杂藻, 对鼠尾藻的幼苗无伤害。

4 结论

鼠尾藻的人工育苗技术趋于完善, 但在育苗早期过程中, 杂藻附着问题还没有简单易行的方法。光质的选择方面可以用白光和蓝光的组合调节生长。药物处理对杂藻生理状态有一定的影响, 但在鼠尾藻幼苗的早期生长过程中不宜使用药物清除杂藻, 在鼠尾藻嫩芽时期用淡水浸泡 30 min, 可清除杂藻, 对鼠尾藻的幼苗无伤害。

参 考 文 献

- Bao J, Tian XL, Dong SL, *et al.* Effect of temperature, salinity and light intensity on nitrogen and phosphorus uptake by *Sargassum thunbergii*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, 2(15): 293–300 [包杰, 田相利, 董双林, 等. 温度、盐度和光照强度对鼠尾藻氮、磷吸收的影响. *中国水产科学*, 2008, 2(15): 293–300]
- Chen J, Zhang JH, Li JQ, *et al.* The growth characteristics of long-line cultured seaweed *Sargassum thunbergii* in the Sanggou Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(1): 120–126 [陈洁, 张继红, 李加琦, 等. 桑沟湾筏式养殖鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*)的生长特性. *渔业科学进展*, 2016, 37(1): 120–126]
- Chen J. A study on farming techniques of *Sargassum thunbergii* and application in integrated multi-tropic aquaculture. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2015, 27–32 [陈洁. 鼠尾藻人工养殖技术及在综合养殖系统中应用的研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2015, 27–32]
- Han JJ, Zhong CH, He PM, *et al.* Effects of different light-qualities on growth and physiological characteristics of free living conchocelis of *Pyropia haitanensis*. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(2): 230–239 [韩军军, 钟晨辉, 何培民, 等. 不同光质 LED 光源对坛紫菜自由丝状体生长和生理特性的影响. *水产学报*, 2017, 41(2): 230–239]
- Han XD, Li LP. Characteristics and utilization of *Sargassum thunbergii*. *Special Economic Animal and Plant*, 2005, 8(1): 27–27 [韩晓弟, 李岚萍. 鼠尾藻特征特性与利用. *特种经济动植物*, 2005, 8(1): 27–27]
- Humphrey GF. The photosynthesis: Respiration ratio of some unicellular marine algae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1975, 18(2): 111–119
- Jia C, Yang B, Xie EY. Studies on the prevention and cure for predators and rivals in artificial breeding of *Sargassum*

- naozhouense* Tseng et Lu. Journal of Aquaculture, 2012, 33(7): 35–39 [贾桢, 杨彬, 谢恩义. 硃洲马尾藻人工育苗常见敌害生物及防治初探. 水产养殖, 2012, 33(7): 35–39]
- Kim JK, Mao YX, Kraemer G, et al. Growth and pigment content of *Gracilaria tikvahiae* McLachlan under fluorescent and LED lighting. Aquaculture, 2015, 436: 52–57
- Li MZ, Ding G, Zhan DM, et al. A method for early production of large-size *Sargassum thunbergii* seedling in North China. Progress in Fishery Sciences, 2009, 30(5): 75–82 [李美真, 丁刚, 詹冬梅, 等. 北方海区鼠尾藻大规格苗种提前育苗技术. 渔业科学进展, 2009, 30(5): 75–82]
- Li SY, Ye DS, Guo WL, et al. Investigation and prevention of harmful organisms for the cultivation of *Sargassum fusiforme* (Harv.) Okam. Modern Fisheries Information, 2009, 24(9): 19–22 [李生尧, 叶定书, 郭温林, 等. 羊栖菜栽培敌害生物调查及其防治. 渔业信息与战略, 2009, 24(9): 19–22]
- Liang ZR, Wang FJ, Sun XT, et al. Effects of light intensity, temperature and salinity on newborn branches of *Sargassum thunbergii* evaluated with chlorophyll fluorescence assay. Marine Sciences, 2011, 35(12): 21–27 [梁洲瑞, 王飞久, 孙修涛, 等. 利用叶绿素荧光技术揭示光照、温度和盐度对鼠尾藻嫩芽的影响. 海洋科学, 2011, 35(12): 21–27]
- Liang ZR, Wang FJ, Sun XT, et al. Primary investigations on the photosynthesis and respiration of leaves of *Sargassum thunbergii* using liquid-phase oxygen measurement system. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(12): 1842–1853 [梁洲瑞, 王飞久, 孙修涛, 等. 利用液相氧电极技术对鼠尾藻叶光合及呼吸作用的初步研究. 水产学报, 2012, 36(12): 1842–1853]
- Liu CY, Sun XQ, Fan SL. Current difficulties encountered and developmental strategies of *Apostichopus japonicus* aquaculture. Feed Industry, 2006, 27(22): 28–30 [刘朝阳, 孙晓庆, 范士亮. 当前刺参养殖面临的主要困境及发展策略. 饲料工业, 2006, 27(22): 28–30]
- Liu QS, Jiang HT, Liu YX, et al. Seed rearing technique of *Sargassum thunbergii* o'kuntze. Shandong Fisheries, 2006(12): 5–9 [刘启顺, 姜洪涛, 刘雨新, 等. 鼠尾藻人工育苗技术研究. 齐鲁渔业, 2006(12): 5–9]
- Sun XT, Wang FJ, Wang WJ, et al. Large scale breeding of *Sargassum thunbergii* based on sexual reproduction. Progress in Fishery Sciences, 2010, 31(3): 84–91 [孙修涛, 王飞久, 汪文俊, 等. 基于有性繁殖的鼠尾藻规模化繁育试验. 渔业科学进展, 2010, 31(3): 84–91]
- Wang C, Qiao HJ, Pan GH, et al. Studies on the parameters of physiology of *Enteromorpha prolifera* collected from the Qingdao Olympic sailing center. Marine Sciences, 2008, 32(8): 13–15 [王超, 乔洪金, 潘光华, 等. 青岛奥帆基地海域漂浮浒苔光合生理特点研究. 海洋科学, 2008, 32(8): 13–15]
- Wang FJ, Sun XT, Li F. Studies on sexual reproduction and seedling-rearing of *Sargassum thunbergii*. Marine Fisheries Research, 2006, 27(5): 1–6 [王飞久, 孙修涛, 李锋. 鼠尾藻的有性繁殖过程和幼苗培育技术研究. 海洋水产研究, 2006, 27(5): 1–6]
- Wang WJ, Sun XT, Wang FJ, et al. Effect of light quality on young sporophyte growth and rhizoid development of *Laminaria japonica* Aresch. Progress in Fishery Sciences, 2009, 30(5): 113–118 [汪文俊, 孙修涛, 王飞久, 等. 光质对海带幼孢子体生长和假根发育的影响. 渔业科学进展, 2009, 30(5): 113–118]
- Wei XY, Yu SG. Studies on the antioxidative activity of ethanolic extracts from two kinds of brown algae. Marine Sciences, 2002, 26(9): 49–51 [魏玉西, 于曙光. 两种褐藻乙醇提取物的抗氧化活性研究. 海洋科学, 2002, 26(9): 49–51]
- Zeng CK. China's economy algae Records. Beijing: Science Press, 1962 [曾呈奎. 中国经济海藻志. 北京: 科学出版社, 1962]
- Zhang EX, Yu LJ, Xiao X. The scavenging action to O_2^- and OH^- of polysaccharides. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 1995, 16(1): 9–11 [张尔贤, 俞丽君, 肖湘. 多糖类物质对 O_2^- 和 OH^- 的清除作用. 中国生化药物杂志, 1995, 16(1): 9–11]
- Zhao FJ. Studies on genetic structure of *Sargassum thunbergii* and *S. muticum* populations and germling development of *S. thunbergii*. Doctoral Dissertation of the Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2007, 65–75 [赵凤娟. 马尾藻种群遗传及早期发育的研究. 中国科学院海洋研究所博士研究生学位论文, 2007, 65–75]
- Zhao HD, Gao SD. Studies of acid tolerance of porphyra and ULVA 1 effects of pH on respiration and growth of *Porphyra Yezoensis* and *Ulva Pertusa*. Journal of Ocean University (Natural Science), 1987, 17(2): 67–71 [赵焕登, 高尚德. 条斑紫菜(*Porphyra yezoensis* Ueda)和孔石莼(*Ulva pertusa* Kjellm)对酸耐受力的研究—I. pH对条斑紫菜和孔石莼呼吸强度和致死酸度试验. 中国海洋大学学报(自然科学版), 1987, 17(2): 67–71]
- Zhao ZG. Study on the early development of three macroalgae species. Doctoral Dissertation of Northeast Normal University, 2008, 35–47 [赵自国. 三种大型海藻的早期发育研究. 东北师范大学博士研究生学位论文, 2008, 35–47]
- Zheng Y. Detection of some Fujian seaweeds for hemagglutinins. Journal of Fujian Normal University (Natural Science), 1994, 10(1): 101–105 [郑怡. 福建部分海藻凝集素的检测. 福建师范大学学报(自然科学版), 1994, 10(1): 101–105]
- Zhuang SH, Hendrik S. The effect of light intensity and quality on the growth of benthic algae community (I) phytopigment variations. Journal of Yantai University (Natural Science and Engineering), 1999, 12(2): 108–113 [庄树宏, Hendrik Sven. 光照强度和波长对底栖藻类种群生长的影响(I)—光合色素的变化. 烟台大学学报(自然科学与工程版), 1999, 12(2): 108–113]
- Zhuang SH, Hendrik S. The effects of light intensity and quality on benthic algae communities (II) the dynamics and adaptive

modes of community and populations. *Acta Ecologica Sinica*, 2001, 21(12): 2057–2066 [庄树宏, Hendrik Sven.光

强和光质对底栖藻类群落影响(II)—群落和种群的动态和适应模式. *生态学报*, 2001, 21(12): 2057–2066]

(编辑 陈严)

Effects of Different Light Quality and Stress Treatments on Photosynthetic Efficiencies and Physiological Characteristics of *Sargassum thunbergii* and Epiphyllous Algae

YUAN Yanmin^{1,2}, LIU Fuli^{2,3}①, LIANG Zhouhui^{2,3}, WANG Wenjun^{2,3}, SUN Xiutao²

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

Abstract In this paper, *Sargassum thunbergii*, *Nitzschia*, *Ulva lactuca*, and *Callithamnion corymbosum* were used as the experimental species to determine the influence of different light qualities (white, blue, and red light), medical treatments (1% ammonium nitrate, 3% ammonium sulfate, and 1% citric acid), and freshwater immersion on their photosynthetic efficiencies. The effectiveness of various harmful algae removal methods which are harmless to young sporophytes of *S. thunbergii*, were also discussed. The results showed that: for RGR (relative growth rate), P_n (apparent photosynthetic rate), and P_n/R (the ratio of apparent photosynthetic rate and respiratory oxygen consumption rate), *S. thunbergii* under blue light were significantly larger than those under white and red light. In comparison, P_n of *Nitzschia* reached its peak under the red light. The P_n of *S. thunbergii* and *Nitzschia* under blue light was significantly higher than that under white and red light, indicating that *S. thunbergii* outcompetes *Nitzschia* under blue light. Irreversible injury appeared when young sporophytes of *S. thunbergii* were exposed to ammonium nitrate, ammonium sulfate, and citric acid. These chemical treatments also inhibited the growth of *C. corymbosum*, but the effects were not significant on newborn branches of *S. thunbergii* and *U. lactuca*. Freshwater treatment caused harm to *S. thunbergii* young sporophytes and *C. corymbosum*, but there was little negative effect on *U. lactuca*, and newborn branches of *S. thunbergii*. These results suggest that in the early stages of *S. thunbergii* cultivation, increasing the irradiation of blue light or reducing the irradiation of red light to a certain extent, can promote the growth of *S. thunbergii*, and inhibit the growth of *Nitzschia*. The use of ammonium nitrate, ammonium sulfate, and citric acid should be avoided in the removal of unwanted algae from young sporelings of *S. thunbergii*. While it is not advisable to use fresh water during the early stages, a fresh water soak for half an hour can remove the unwanted algae and causes no harm to the newborn branches of *S. thunbergii*.

Key words *Sargassum thunbergii*; Unwanted-algae; Light qualities; Medicine treatment; Fresh water treatment

① Corresponding author: LIU Fuli, E-mail: liufl@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190121001

http://www.yykxjz.cn/

夏斌, 杜雨珊, 赵信国, 朱琳, 陈碧鹃, 孙雪梅, 曲克明. 微塑料在海洋渔业水域中的污染现状及其生物效应研究进展. 渔业科学进展, 2019, 40(3): 178-190

Xia B, Du YS, Zhao XG, Zhu L, Chen BJ, Sun XM, Qu KM. Research progress on microplastics pollution in marine fishery water and their biological effects. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(3): 178-190

微塑料在海洋渔业水域中的污染现状 及其生物效应研究进展*



夏斌^{1,2#①} 杜雨珊^{1,3#} 赵信国^{1,2} 朱琳^{1,2}
陈碧鹃^{1,2} 孙雪梅^{1,2} 曲克明¹

1. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋生态与环境科学功能实验室 青岛 266071;
3. 上海海洋大学海洋科学学院 上海 201306)

摘要 海洋塑料污染已成为与全球气候变化、臭氧耗竭、海洋酸化并列的重大全球环境问题,其中尺寸小于5 mm的塑料碎片或颗粒(微塑料)更是倍受全球关注的新型污染物。研究表明,微塑料在海洋渔业水域中广泛存在,而且,作为人类优质蛋白重要来源的海洋渔业生物也已受到微塑料的污染。因此,微塑料在海洋渔业水域中的污染现状及其生物效应研究越来越受到关注。本文总结了海洋渔业水域中微塑料的主要来源及污染现状,归纳了微塑料对海洋渔业生物的主要毒性效应及致毒机制,探讨了微塑料沿食物链的传递作用及其对水产品质量安全的潜在影响,剖析了当前研究所面临的问题,并对未来的研究工作进行了展望,以期科学评估微塑料对海洋渔业资源和水产品质量安全的影响提供科学依据。

关键词 微塑料; 海洋渔业; 食物链; 毒性效应; 水产品质量安全

中图分类号 X55 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)03-0178-13

塑料制品由于轻便、可塑性强和耐用等特性而被广泛应用于航空、航天、军事、农业、工业以及日常生活等多个领域。据统计,全球塑料年产量已经从1950年的150万t激增至2017年的约3.48亿t,并

且还在不断增加(Plastics Europe, 2018)。随着塑料的大量生产和使用,这势必会导致每年有数量庞大的塑料垃圾进入海洋。据预测,到2025年,全球海洋中塑料垃圾量将高达2.5亿t(Jambeck *et al*, 2015)。联合

* 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋生态与环境科学功能实验室青年人才培养项目(LMEES-YTSP-2018-04-01)、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022019007; 20603022018011)和青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋生态与环境科学功能实验室创新团队项目(LMEES-CTSP-2018-4)共同资助 [This work was supported by the Youth Talent Support Program of the Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao) (LMEES-YTSP-2018-04-01), the Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Yellow Sea Fisheries Research Institutes (20603022019007; 20603022018011), and Creative Team Project of the Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao) (LMEES-CTSP-2018-4)]. # 并列第一作者: 夏斌, E-mail: xiabin@ysfri.ac.cn; 杜雨珊, E-mail: 1336352118@qq.com

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

收稿日期: 2019-01-21, 收修改稿日期: 2019-02-11

国环境规划署(UNEP)发布的报告指出,海洋塑料垃圾给全球海洋生态系统造成的经济损失超过 80 亿美元,其中,仅水产品损失就达 31 亿美元(UNEP, 2016)。2015 年召开的第二届联合国环境大会上,海洋塑料污染被列入与全球气候变化、臭氧耗竭、海洋酸化并列的重大全球环境问题。

通常将尺寸小于 5 mm 的塑料碎片或颗粒定义为微塑料(Thompson *et al*, 2004)。海洋微塑料主要分为初生微塑料和次生微塑料。初生微塑料是指工业生产过程中被制备成粒径小于 5 mm 的塑料颗粒,如牙膏、洁面乳和空气清新剂中的塑料微粒等;次生微塑料是指大尺寸的塑料垃圾经过物理、化学和微生物作用分裂或降解而成的塑料微粒。微塑料因其持久性和高迁移性,已在全球海洋中普遍存在(Chae *et al*, 2017),被形象地称为“海洋中的 PM2.5”。海洋中的微塑料既是海洋污染物,直接对海洋生物产生毒性效应(Barboza *et al*, 2015; Yin *et al*, 2018; 陈启晴等, 2018),也是有毒污染物和微生物的传播载体,间接影响海洋生物(Carbery *et al*, 2018; 何蕾等, 2018)。2018 年,《Science》报道,海洋微塑料吸附的有害物质能引起珊瑚礁疾病率的增加,使骨骼侵蚀带病(Skeletal eroding band disease)增加 24%,白化病上升 17%,黑带病上升 5%(Lamb *et al*, 2018)。由此可见,微塑料已成为倍受国际关注的新型污染物(Galloway *et al*, 2016),其海洋环境效应已成为国内外的研究热点(Barboza *et al*, 2015)。

据联合国粮农组织(FAO)统计,2014 年,渔业资源为全球 43 亿人口提供了约 15%的优质蛋白(FAO, 2014),作为人类获取优质蛋白的重要来源,至 2026 年,全球渔业产量将达到 1.94 亿 t。但迄今,已在全球 233 种海洋生物体内发现了微塑料(Wilcox *et al*, 2015),表明海洋生物已经受到了微塑料的污染,不禁引发人们对水产品质量安全和人体健康的担忧。渔业水域是指适宜水产捕捞、水产增殖的水生经济动植物繁殖、生长、索饵和越冬洄游的水域总称。本文通过对国内外研究成果的归纳和总结,分析微塑料在海洋渔业水域的污染现状,阐述微塑料对海洋渔业生物的毒性效应及潜在的水产品质量安全风险,并对未来的研究前景进行展望,以期为准评估微塑料对海洋渔业资源和水产品质量安全的影响提供科学依据。

1 海洋渔业水域中微塑料的主要来源

海洋渔业水域中微塑料的主要来源有:

(1) 陆源输入 陆地上的塑料袋、泡沫和纤维

等塑料垃圾经过风力作用和雨水冲刷,通过地表径流进入海洋环境,引起海洋塑料污染。2017年《Nature Communications》期刊报道,全球每年有115~241万t塑料垃圾从河流进入海洋(Lebreton *et al*, 2017)。陆源输入是海洋渔业水域微塑料的一个主要来源。

(2) 滨海旅游 在人口活动密集的海滩等海滨旅游景点,由于沙滩比热低、升温快、光氧化速度快,被游客随意丢弃的塑料包装袋、矿泉水瓶等塑料垃圾,易破碎形成微塑料进入到海洋环境中。

(3) 船舶运输 海上过往船舶向海洋丢弃大量的塑料垃圾也是微塑料的一个重要来源。据UNEP(2005)估算,2005年全球船舶运输过程中输入到海洋的塑料垃圾达到500万t。此外,海上航运事故也会导致大量塑料产品进入海洋。

(4) 渔业捕捞 在底栖挖泥和拖网作业的渔业捕捞活动中,渔绳和渔网会因磨损、截断而耗损,从而增加海洋渔业水域中微塑料的含量。另外,由于这些渔具的长期使用和维护力度不足,每年会有大量塑料渔具被遗弃在海洋中(Macfadyen *et al*, 2009)。Lusher等(2013)发现,海洋生物体内摄入的塑料纤维与常用的渔具结构相似,从而证实生物体内的微塑料污染与当地的渔业生产活动有密切关联(Dantas *et al*, 2012; Witte *et al*, 2014; Mathalon *et al*, 2014)。

(5) 养殖设施 近海网箱和筏式养殖过程中大量使用渔网、渔绳和浮球等塑料制品,其老化破损都会造成大量塑料碎片进入海洋。Mathalon等(2014)研究发现,与野生贻贝相比,人工养殖的贻贝体内塑料纤维的含量较高。

(6) 大气沉降 Dris等(2016)对大气沉降物质组成进行了分析,发现50%为天然纤维沉降物,21%为经过人工加工的天然纤维,17%为人造塑料纤维(主要为聚对苯二甲酸乙二醇酯),12%为人造混合纤维(聚对苯二甲酸乙二醇酯和聚氨酯的混合纤维以及棉和聚酰胺的混合纤维)。这表明大气沉降可能是海洋渔业水域中微塑料的来源。

2 海洋渔业水域中微塑料的分布特征

在风力和洋流作用下,海洋环境中的微塑料会进行远距离迁移,已广泛分布在河口、近海、远洋、极地和深海等全球各处海域。一般来说,风、表面流和地转环流可以促进大粒径的微塑料进行大范围扩散(Law *et al*, 2010)。在较小范围内,湍流和潮汐会导致沉积物中的微塑料再次悬浮(Ballent *et al*, 2012, 2013)。

表 1 全球不同渔业水域海水中微塑料的分布特征
Tab.1 Distribution characteristics of microplastics in global fishery regions

调查区域 Surveyed area	粒径 Diameter	丰度 Abundance	形状 Shape	颜色 Color	成分 Components	主要生物 Major species	参考文献 Reference
中国东海	0.5~5 mm	(0.167±0.138) ind./m ³	纤维、薄膜	透明、彩色、 白色、黑色	—	小黄鱼、带鱼、对虾、梭子蟹科	Zhao 等(2014)
中国北黄海	<1 mm	(545±282) ind./m ³	薄膜、纤维	透明	PE、PP	小黄鱼、带鱼、鲛鱼、黄鲫、	Zhu 等(2018)
中国渤海	0.3~5 mm	(0.33±0.34) ind./m ³	碎片、纤维、薄膜	白色、透明、 绿色	PE、PP、PS	小黄鱼、带鱼、黄鲫	Zhang 等(2017)
中国象山港	0.25~2 mm	(8.91±4.70) ind./m ³	泡沫、纤维	白色、绿色、 半透明、黑色	PE、PP	大小黄鱼、带鱼、鲳鱼、鳗鱼	Chen 等(2018)
大西洋	<5 mm	(2.46±2.43) ind./m ³	纤维、碎片、微珠、泡沫	蓝色、黑色、 灰色	—	鲭鱼、鲱鱼、鳕鱼	Lusher 等(2014)
地中海	<2 mm	(0.90±0.10) ind./g	纤维、碎片	黑色、蓝色	—	金枪鱼	Glagani(2012)
南加州沿岸水域	>0.35 mm	7.25 ind./m ³	碎片、薄膜	—	—	鲍、蛙鱼、鳗鱼、牡蛎、贻贝	Moore 等(2002)
韩国南部海岸	<50 μm	(103±59) ind./L	碎片、球体、纤维	绿色、蓝色	AK、PEA、PS	海藻类、鳀鱼、牡蛎	Song 等(2014)
南太平洋副热带环流	<5 mm	0.024 ind./m ²	碎片、纤维、薄膜、球状	—	PS、PP	竹筴鱼、金枪鱼	Eriksen 等(2013)
奥地利多瑙河	<20 mm	(0.32±4.67) ind./m ³	球状、片状	—	—	奥地利六须鲶	Lechner 等(2014)
葡萄牙海岸	<5 mm	0.002~0.036 ind./m ³	碎片	—	PE、PP、PA	沙丁鱼、竹筴鱼、金枪鱼	Frias 等(2014)
太平洋	684±953 μm	(279±178) ind./m ³	纤维	蓝色、红色、 黑色和紫色	—	金枪鱼、鳀鱼、沙丁鱼	Desforges 等(2014)
加拿大夏洛特皇后湾	398±376 μm	(7630±1410) ind./m ³	纤维	—	—	鲈鱼、鳕鱼	Desforges 等(2014)
加拿大温哥华岛西海岸	558±521 μm	(1710±1110) ind./m ³	纤维	—	—	鲱鱼	Desforges 等(2014)
加拿大兰伯特海峡	<5 mm	2.5200~25300 ind./kg	球状、纤维、碎片	—	—	太平洋牡蛎	Kazmiruk 等(2018)
Jurujuba 湾	<5 mm	16.4 ind./m ³	碎片、纤维、薄片	蓝色、绿色、 红色	PE、PP	贻贝	Castro 等(2016)
白令海	<2.5 mm	(0.004~0.19) ind./m ³	碎片、纤维、球状	—	—	鲑鱼、比目鱼、绿鳕	Doyle 等(2011)

注：PE：聚乙烯；PP：聚丙烯；PS：聚苯乙烯；PA：聚酰胺；AK：醇酸树脂；PEA：聚丙烯酸酯
Note: PE: Polyethylene; PP: Polypropylene; PS: Polystyrene; PA: Polyamide; AK: Alkyd resin; PEA: Polyacrylate

表 1 概括了不同渔业水域内微塑料的丰度、粒径、形状、颜色和成分:

(1) 从微塑料丰度分析, 空间分布非常不均匀。韩国养殖水域微塑料含量较高, 达到 10^5 ind./m^3 (Song *et al.*, 2014), 而葡萄牙海岸海水微塑料含量仅为 10^{-3} ind./m^3 (Frias *et al.*, 2014)。

(2) 从微塑料的粒径分析, 不同渔业水域微塑料的粒径差异较大。例如, 在加拿大温哥华岛西海岸检测到的微塑料 ($558 \pm 521 \mu\text{m}$) 丰度为 (1710 ± 1110) ind./m^3 (Desforges *et al.*, 2014)。在捕捞活动密集的渔业水域, 如中国长江口和东海海岸, 绝大多数的塑料颗粒以小粒径的形式存在, $0.5 \sim 5 \text{ mm}$ 的微塑料占 90% 左右 (Zhao *et al.*, 2014), 而我国象山港的微塑料粒径主要分布在 $0.25 \sim 2 \text{ mm}$, 平均粒径为 (1.54 ± 1.53) mm (Chen *et al.*, 2018)。

(3) 从微塑料的形状分析, 主要为纤维状、碎片、薄膜和球状, 其中, 纤维状微塑料是渔业水域中最常见的微塑料, 这主要是由于捕捞和养殖活动中渔绳和渔网的破损, 导致纤维状微塑料所占比例较高。例如, 加拿大夏洛特皇后湾水产养殖设施高度集中, 当地纤维状微塑料的数量显著增加 (Desforges *et al.*, 2014)。在捕捞活动密集的东北大西洋和东北太平洋, 纤维状塑料占了 70% 以上 (Lusher *et al.*, 2014; Desforges *et al.*, 2014)。但在韩国南部海岸, 微塑料主要以颗粒碎片的形式存在, 特别是醇酸树脂类(船身常用的粘合剂涂料)的油漆颗粒 (Song *et al.*, 2014)。由此可见, 韩国南部海岸微塑料的主要来源不是渔业生产活动, 而是船舶运输。

(4) 从微塑料的颜色分析, 不同渔业水域微塑料的颜色组成差异很大, 但大多以蓝色、白色、红色、黑色和透明为主, 其中, 东北大西洋中蓝色微塑料占 37.7%, 而该海域海洋生物体内摄入最多的微塑料也是蓝色纤维状 (Lusher *et al.*, 2014)。

(5) 从微塑料的成分分析, 主要以聚丙烯、聚乙烯、聚苯乙烯和聚酰胺等成分为主, 是塑料制品中产量最高的一些种类。此外, 这些成分的塑料也常用于养殖和捕捞活动中, 如聚苯乙烯常用来制作水产养殖中的泡沫浮标, 聚丙烯、聚乙烯和聚酰胺多用于制成捕捞用的渔绳、渔网和渔线。已有研究表明, 我国象山港作为历史悠久的海水养殖区, 检测到的微塑料成分多以聚苯乙烯为主, 约占 38.6% (Chen *et al.*, 2018)。

综上所述, 在海洋渔业水域中, 微塑料丰度和粒径分布差异较大, 形状以纤维状和颗粒碎片状为主, 颜色主要为蓝色、白色、红色、黑色和透明色, 主要

成分为聚丙烯、聚乙烯和聚苯乙烯。

3 微塑料对海洋渔业生物毒性效应

微塑料广泛分布于海洋渔业环境水域中, 由于其粒径小, 极易被渔业生物摄入 (Moore *et al.*, 2001), 进而产生一系列毒性效应 (表 2), 主要包括抑制生长发育、影响摄食及行为能力、生殖毒性、免疫毒性、遗传损伤等。

3.1 抑制生长发育

微塑料会抑制海洋渔业生物的生长发育。例如, 沉积物中的聚苯乙烯微塑料 ($40 \sim 1300 \mu\text{m}$) 会显著抑制沙蚕 (*Arenicola marina*) 的生长, 且抑制程度与微塑料的浓度呈正相关 (Besseling *et al.*, 2013)。聚乙烯微塑料会抑制海胆 (*Tripneustes gratilla*) 的摄食与生长, 但不会对海胆产生致死效应 (Kaposi *et al.*, 2014)。微塑料被海洋渔业生物摄入体内后会在消化道中累积并阻塞消化道 (Browne *et al.*, 2008; Wilcox *et al.*, 2015), 产生饱腹感, 导致其摄食能力下降, 体内能量储备减少 (Wright *et al.*, 2013), 从而影响渔业生物的生长。Yin 等 (2018) 研究发现, 聚苯乙烯微塑料显著影响了许氏平鲷 (*Sebastes schlegelii*) 的能量储备, 降低了生物体的营养品质。Bour 等 (2018) 观察到暴露在较大塑料颗粒下 ($125 \sim 500 \mu\text{m}$) 的双壳贝类, 发现其蛋白质和脂质含量未发生变化, 但总的能量储备随着暴露微塑料的含量增加而降低。粒径为 $1 \sim 50 \mu\text{m}$ 的聚乙烯微塑料会破坏紫贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*) 的体内平衡, 导致紫贻贝能量消耗增加和生长速率下降 (Detree *et al.*, 2018)。

3.2 影响摄食及行为能力

摄入微塑料会影响渔业生物的摄食和行为能力。研究表明, 聚苯乙烯微塑料 ($1 \times 10^6 \text{ ind./L}$) 会显著降低许氏平鲷 (*S. schlegelii*) 的摄食和游泳能力, 缩小许氏平鲷的活动范围, 增强许氏平鲷的集群行为 (Yin *et al.*, 2018)。聚乙烯微塑料暴露后, 鰕虎鱼 (*Pomatoschistus microps*) 的游泳能力下降 (Oliveira *et al.*, 2013), 捕食能力减弱 (Ferreira *et al.*, 2016), 并且出现嗜睡的特征 (Oliveira *et al.*, 2013)。当沙蚕 (*A. marina*) 处于高浓度的微塑料暴露中, 也会引发炎症反应, 降低能量储备, 并且导致其摄食活动受到抑制 (Wright *et al.*, 2013)。但也有研究发现, 在微塑料和芘联合暴露下, 尖吻鲈 (*Lates calcarifer*) 幼鱼的摄食能力没有受到显著影响, 但游泳速度明显下降 (Guvén *et al.*, 2018)。

表2 微塑料对海洋渔业生物的毒性效应

Toxic effect		受试物种		尺寸	成分	暴露剂量	观察到的效应		参考文献
		Tested species	Size	Components	Exposure dose	Observed effects		Reference	
生长发育	沙蚕	<i>Arenicola marina</i>	40~1300 μm	PS	0, 1, 10, 100 g/L	体重降低, 影响生长发育		Besseling 等(2013)	
	海胆	<i>Tripneustes gratilla</i>	10~45 μm	PE	1, 10, 100, 300 g/ml	摄食量增多		Kaposi 等(2014)	
	双壳类	<i>Abra nitida</i> ; <i>Ennucula tenuis</i>	4~6; 20~25; 125~500 μm	PE	1, 10, 25 mg/kg	影响能量储备		Bour 等(2018)	
摄食及	地中海贻贝	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	1~50 μm	HDPE	4.6×10^5 ind./L	影响能量消耗, 生长速度降低		Detree 等(2018)	
行为能力	许氏平鲉	<i>Sebastes schlegelii</i>	15 μm	PS	1×10^6 ind./L	影响能量储备、摄食能力、游泳速度及集群行为		Yin 等(2018)	
	尖吻鲈	<i>Lates calcarifer</i>	97 μm	PS	100 ind./L	游泳速度降低		Guvan 等(2018)	
生殖毒性	沙蚕	<i>Arenicola marina</i>	130 μm	UPVC	0~5%(质量分数)	影响摄食量、能量储备、炎症反应		Wright 等(2013)	
免疫毒性	太平洋牡蛎	<i>Crassostrea gigas</i>	2, 6 μm	PS	0.023 mg/L	影响能量分配、生长繁殖		Sussarellu 等(2016)	
	海鲷	<i>Sparus aurata</i>	40~150 μm	PVC, PE	1, 10, 100 mg/ml	导致氧化损伤和免疫毒性		Espinosa 等(2018)	
	海鲈	<i>Dicentrarchus labrax</i>							
	紫贻贝	<i>Mytilus edulis</i>	0~80 μm	HDPE	2.5 g/L	溶酶体膜不稳定, 免疫反应		von Moos 等(2012)	
	地中海贻贝	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	0~50 μm	PE	1.5×10^7 ind./L	导致组织损伤、氧化应激、免疫应答以及细胞凋亡		Detree 等(2017)	
遗传损伤	海胆	<i>Paracentrotus lividus</i>	50 nm	PS	10, 25 $\mu\text{g/ml}$	吞噬细胞的溶酶体膜不稳定和细胞凋亡		Marques-Santos 等(2018)	
	地中海贻贝	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	<100 μm	PE, PS	1.5 g/L	导致免疫反应、神经毒性、基因毒性		Avio 等(2015a)	

注: HDPE: 高密度聚乙烯; UPVC: 硬聚氯乙烯; PVC: 聚氯乙烯

Note: HDPE: High density polyethylene; UPVC: Unplasticized polyvinyl chloride; PVC: Polyvinyl chloride

3.3 生殖毒性

微塑料会危害海洋生物的生殖健康。在聚苯乙烯微塑料的暴露下,太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)排出的卵细胞数量显著降低,精子的运动水平下降,表明微塑料会显著抑制太平洋牡蛎的繁殖能力(Sussarellu *et al.*, 2016)。目前,关于微塑料对渔业生物生殖毒性的研究还很少,只有一些对其他海洋生物的报道。例如,Ogonowski 等(2016)研究表明,微塑料(10^5 ind./ml)会导致大型溞(*Daphnia magna*)的死亡率升高,还会减弱大型溞的繁殖能力。Sussarellu 等(2016)将太平洋牡蛎亲本暴露在聚苯乙烯微球中,显示微塑料影响牡蛎亲本的能量分配和生殖腺的成熟。Lee 等(2013)研究发现,当聚苯乙烯微塑料($0.05\ \mu\text{m}$)浓度大于 $12.5\ \mu\text{g/ml}$ 时,会导致日本虎斑猛水蚤(*Tigriopus japonicus*)下一代的死亡;而在 $0.5\ \mu\text{m}$ 聚苯乙烯微塑料暴露下,最高浓度组($25\ \mu\text{g/ml}$)同样会导致日本虎斑猛水蚤子代存活率显著下降。Jeong 等(2017)研究发现,与 $0.5\ \mu\text{m}$ 和 $6\ \mu\text{m}$ 的聚苯乙烯微塑料相比, $0.05\ \mu\text{m}$ 微粒可以穿过海洋桡足类的细胞膜,引起细胞损伤和氧化应激,最终导致桡足类生长速率下降和繁殖能力减弱。Cole 等(2015)研究表明, $20\ \mu\text{m}$ 聚苯乙烯微塑料长期暴露显著影响了海洋桡足类的能量储备和繁殖能力,不利于种群繁殖的稳定性。

3.4 免疫毒性

微塑料在进入海洋渔业生物组织和器官后,会引发一系列的免疫反应。例如,粒径为 $40\sim 150\ \mu\text{m}$ 的聚氯乙烯(PVC)和聚乙烯(PE)微塑料会对海鲷(*Sparus aurata*)和海鲈(*Dicentrarchus labrax*)的白细胞产生氧化损伤,从而产生免疫毒性,并且 PVC 的毒性要大于 PE (Espinosa *et al.*, 2018)。另外,有研究发现,粒径为 $3.0\ \mu\text{m}$ 和 $9.6\ \mu\text{m}$ 的微塑料会从紫贻贝(*Mytilus edulis*)的内脏转移到淋巴系统,但没有产生生物效应(Browne *et al.*, 2008),而粒径小于 $80\ \mu\text{m}$ 的高密度聚乙烯微塑料可进入贻贝的消化系统,导致贻贝血流粒细胞增多和溶酶体膜不稳定,从而引发机体免疫系统的炎症反应(von Moos *et al.*, 2012)。在聚乙烯微塑料(1.5×10^7 ind./L)暴露下,会引起紫贻贝(*M. galloprovincialis*)氧化应激、免疫应答以及细胞凋亡(Detree *et al.*, 2017)。Granby 等(2018)研究表明,用微塑料和卤代污染物投喂海鲈,会增加鲈鱼对卤代污染物的富集量,肝脏代谢及基因表达异常,同时也引起氧化应激和免疫反应。还有研究将海胆(*Paracentrotus lividus*)暴露于氨基修饰聚苯乙烯纳米微塑料(10 和 $25\ \mu\text{g/ml}$)中,引起吞噬细胞的溶酶体膜的不稳定和细胞凋亡,

表明聚苯乙烯纳米微塑料对海胆产生免疫毒性(Marques-Santos *et al.*, 2018)。

3.5 遗传损伤

微塑料会对海洋渔业生物产生遗传损伤。研究显示,微塑料吸附多环芳烃后会对紫贻贝(*M. galloprovincialis*)产生免疫毒性、神经毒性以及基因毒性,这会造成贻贝的遗传损伤(Avio *et al.*, 2015a)。但是,目前有关微塑料对海洋渔业生物遗传毒性的研究还很少,只有一些对其他海洋生物的报道。Besseling 等(2014)研究表明,大型溞(*D. magna*)体型的缩小与纳米聚苯乙烯塑料颗粒的暴露有关,导致其子代数量减少以及畸形率上升。

4 微塑料对海洋渔业生物的致毒机制

微塑料对海洋渔业生物产生毒性效应的致毒机制主要包括摄入微塑料对渔业生物的影响、微塑料与其他污染物的复合效应,以及微塑料作为微生物、附生动植物载体产生的影响。

4.1 摄入微塑料对渔业生物的影响

微塑料广泛存在于海洋环境中,由于其粒径较小,易被渔业生物误食。Browne 等(2008)使用带荧光标记的聚苯乙烯微塑料球混合微藻投喂紫贻贝(*M. edulis*),随后在贻贝肠道和循环系统中均发现了微塑料颗粒,这表明贻贝能够直接从环境中摄入微塑料。在近海的渔业生物体中也发现了微塑料。Jabeen 等(2017)在长江口、东海以及南海收集了 21 种海水鱼,检测发现,所有海水鱼的胃肠道中均含有微塑料,其中纤维状是最常见的形状。Ory 等(2017)在中国沿岸 17 个站点采集了养殖牡蛎,检测发现 84%的牡蛎中含有微塑料。微塑料被渔业生物摄食后,可经由胃肠道转移至其他组织或器官中,从而对渔业生物产生物理性损害。von Moos 等(2012)将紫贻贝(*M. edulis*)暴露于聚乙烯微塑料中,观察紫贻贝消化腺部位的内吞情况,发现聚乙烯微塑料较易被紫贻贝消化腺的上皮细胞所摄取,且在细胞、组织结构上对贝类生物体造成较大损伤。Avio 等(2015b)发现聚乙烯、聚苯乙烯微塑料(粒径 $0.2\sim 0.6\ \text{mm}$)由鱼类胃肠道转移至肝脏中。

微塑料的粒径、表面电荷等性质是影响其被生物富集的重要因素(Lusher *et al.*, 2017)。一般而言,粒径越小,进入生物体后更容易被吸收。已有研究证实, $50\sim 100\ \text{nm}$ 的聚苯乙烯塑料微球比 $300\sim 3000\ \text{nm}$ 的微球更容易被派尔集合淋巴结和肠道绒毛吸收(Jani

et al, 1992; Florence *et al*, 2001)。但是, 渔业生物对摄取食物的粒径也有一定的选择性。研究发现, 相比于 2 μm 的微塑料, 太平洋牡蛎更倾向摄食 6 μm 的聚苯乙烯微球(Sussarellu *et al*, 2016)。所以在研究微塑料的毒性效应及致毒机制时, 应考虑把渔业生物的摄食习性纳入研究的范畴(Mizraji *et al*, 2017)。

4.2 微塑料与其他污染物的复合效应

在海洋环境中, 微塑料比表面积大, 且具有高疏水性, 易吸附不同类型的环境污染物(如多氯联苯、多环芳烃、氯化农药以及重金属等)。微塑料被海洋渔业生物摄食后, 在一定条件下会释放出吸附的污染物。有研究表明, 在生物体肠道环境中微塑料对污染物的解吸速率比在海水中高出 30 多倍(Bakir *et al*, 2014), 从而对渔业生物产生更强的毒性效应(徐擎擎等, 2018)。Avio 等(2015a)研究发现, 聚乙烯微塑料与多环芳烃的复合污染导致紫贻贝(*M. galloprovincialis*)对多环芳烃的吸收利用率明显提高。Barboza 等(2018)发现塑料微球改变了汞在鲈鱼(*D. labrax*)脑部和肌肉中的富集量。Rochman 等(2013)的研究表明, 当鱼类摄入吸附了有机污染物的聚乙烯微粒之后, 微塑料会在鱼体内累积并产生胁迫作用, 还会影响多环芳烃受体(AhR)基因的表达。另一项研究发现, 与仅暴露于荧葱的贻贝(*Mytilus* spp.)相比, 在同时暴露于微塑料和荧葱的贻贝中检测到更高的荧葱浓度, 且贻贝的组织病理学损伤更加显著, 这说明微塑料结合其他污染物后具有明显的复合毒性(Paul-Pont *et al*, 2016)。Rochman 等(2014)研究发现, 日本青鳉(*Oryzias latipes*)摄食表面吸附有多氯联苯、多环芳烃和多溴二苯醚等污染物的微塑料后, 鱼体内雌激素受体(ER α)、卵黄蛋白原(Vtg I)、卵壳前体蛋白(Chg H)的基因表达水平发生改变, 表明微塑料与上述有机污染物的复合污染影响了日本青鳉的内分泌系统功能。微塑料除了与吸附污染物产生复合毒性外, 其自身携带的化学添加剂在海洋环境中浸出后也会对渔业生物产生毒性。这些添加剂包括增塑剂、阻燃剂、塑化剂和双酚 A 等有毒物质。以双酚 A 为例, 作为聚乙烯、聚丙烯和聚氯乙烯等塑料聚合物的添加剂, 能引起内分泌失调, 并具有一定的胚胎毒性和致畸性。此外, 新陈代谢紊乱导致的肥胖和乳腺癌也被认为与双酚 A 有关(韩林等, 2016)。

目前研究表明, 微塑料本身的毒性是相对较小的, 环境浓度下的微塑料基本不会对海洋生物产生毒性效应, 但微塑料在吸附环境污染物后, 会显著增强

吸附污染物的毒性效应。例如, 纳米级微塑料增强了四溴联苯醚和三氯生对海洋轮虫(*Brachionus koreanus*)的毒性效应(Jeong *et al*, 2018), 因此, 微塑料与其他污染物对海洋渔业生物的复合效应须引起高度重视。海洋环境中微塑料与污染物的复合效应对海洋生物的毒性作用更加复杂, 需要全面了解微塑料对污染物的吸附、解吸、释放和运输过程, 相关的致毒机制及影响因素亟待进一步研究, 以便更加准确地评价微塑料的渔业环境效应。

4.3 微塑料作为微生物、附生动植物的载体作用

微塑料在进入海洋环境后, 容易吸附排泄物、有机物和无机营养盐, 进而吸引微生物和浮游动植物附着其表面上。在北太平洋环流区的一项研究表明, 微塑料表面聚集的微生物主要包括芽孢杆菌、球状菌和羽状硅藻等(Carson *et al*, 2013)。同时, Oberbeckmann 等(2014)发现, 收集自英国北海的塑料颗粒表面附着了拟杆菌门(Bacteroidetes)、变形菌门(Proteobacteria)和蓝细菌门(Cyanobacteria)的细菌。Jiang 等(2018)采用高通量测序技术对中国长江口潮间带微塑料样品上的细菌群落进行分析, 发现主要细菌为 α -变形菌(Alphaproteobacteria)、 γ -变形菌(Gammaproteobacteria)、黄杆菌属(Flavobacteriia)、酸杆菌门(Acidobacteria)以及蓝细菌门(Cyanobacteria)。还有研究在北海、波罗的海和北大西洋的微塑料表面检测出致病弧菌(*Vibrio* spp.) (Zettler *et al*, 2013; Kirstein *et al*, 2016)。随着微塑料的不断迁移, 可能促使附着在其表面的致病菌迅速扩散, 导致大面积感染事件, 甚至危害人体健康。另外, 微塑料也能够为浮游生物提供稳定的栖息生境, 使其获得丰富的营养, 进而吸引较低营养级渔业生物对微塑料的摄食, 同时可能会加剧摄食后引起的毒性效应。相关研究发现, 在地中海西北部海岸的微塑料上, 附着了底栖硅藻、小型甲藻以及有害甲藻(Masó *et al*, 2003)。一旦这些微塑料迁移到适宜有害甲藻生长的海域, 可能会急剧繁殖扩散, 释放大量毒素, 影响水产品质量安全, 最终对人类健康产生潜在危害。

虽然微塑料对微生物和浮游动植物的载体作用, 至今尚未开展系统深入的研究, 很多结论未能获得有效的数据支持, 但微塑料表面黏附的致病菌和有毒藻类, 随着微塑料的迁移, 很可能引发海洋生态灾难, 其潜在影响应引起高度重视。今后应加强对海洋微塑料附着生物种类和丰度的研究, 并积极探索可能带来的环境风险和生态效应。

5 微塑料在食物链中的传递作用

由于尺寸小、难降解,微塑料易被海洋生物摄入,并且蓄积在体内。目前,已在原生生物、桡足类、环节动物、棘皮动物、刺细胞动物、端足类、十足类、等足类、软体动物和鱼类等大量海洋生物体内发现了微塑料(Christaki *et al.*, 1998; Thompson *et al.*, 2004; Besseling *et al.*, 2013; Cole *et al.*, 2013; Tanaka *et al.*, 2013; Ugolini *et al.*, 2013; Hamer *et al.*, 2014; Kaposi *et al.*, 2014; Watts *et al.*, 2014; Avio *et al.*, 2015b; Hall *et al.*, 2015; Nobre *et al.*, 2015; Peda *et al.*, 2016)。更令人担忧的是,微塑料还会沿着食物链,从低营养级生物传递至高营养级生物(图1)。据 Farrell 等(2013)报道,用体内蓄积有 $0.5\ \mu\text{m}$ 聚苯乙烯塑料微球的紫贻贝饲喂青蟹(*Carcinus maenas*)后,微塑料颗粒随之出现在青

蟹的胃、肝脏和血淋巴等组织器官中,并检测到血淋巴中的微塑料含量最高。Cedervall 等(2012)发现,聚苯乙烯纳米颗粒会沿着栅藻(*Scenedesmus sp.*)-大型溞(*Daphnia magna*)-鲫鱼(*Carassius carassius*)三级食物链传递,最终蓄积在鲫鱼体内。与对照组相比,通过食物链富集微塑料后,鲫鱼的群集行为、生理状态和脂质代谢强度均发生显著改变(Mattsson *et al.*, 2015)。但也有研究发现,微塑料可以从丰年虾传递至斑马鱼体内,但并没有在斑马鱼体内蓄积,可能是由于微塑料以粪便的形式被斑马鱼排出体外(Batel *et al.*, 2016)。此外,在食物链传递过程中,微塑料携带的有毒污染物以及病原微生物可能会一同转移至高营养级生物,并在高营养级生物体内扩散,最终危害海洋生态系统乃至人类健康。

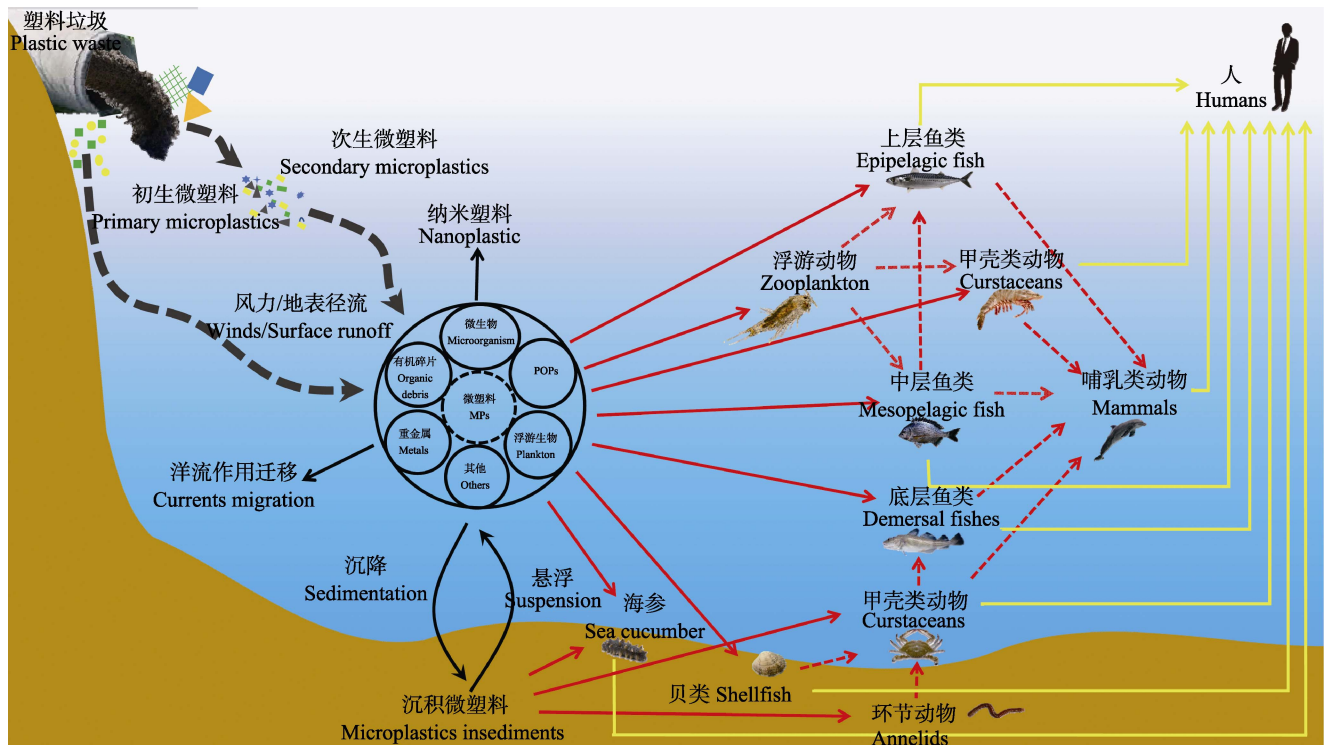


图1 海洋中微塑料的环境行为及其在海洋食物网中的传递(修改自刘强等, 2017)

Fig.1 Environmental behavior of microplastics in the ocean and their transfer in marine food web (revised from Liu *et al.*, 2017)

黑色的箭头表示微塑料在海洋环境内的环境行为。红色箭头表示生物体直接摄入微塑料。红色虚线箭头指示间接摄取微塑料(潜在的营养转移)。黄色箭头表示的是人类通过食用海产品摄入微塑料

Black arrows indicate the fate of microplastics in the marine environment. The red arrow indicates the direct uptake of microplastics. Red dotted arrows indicate indirect uptake of microplastics (potential trophic transfer). The yellow arrow indicates that humans consume the microplastics through eating seafood

6 微塑料对水产品质量安全的潜在影响

水产品是人类获取优质蛋白的重要来源。目前,微塑料在鱼类、贝类、虾类和蟹类等渔业生物体内均

有检出(Kaposi *et al.*, 2014; van Cauwenberghe *et al.*, 2014; Liboiron *et al.*, 2016),表明渔业生物已经受到微塑料的污染,引起人们对水产品质量安全的关注。微塑料对水产品质量安全的潜在影响主要包括三个方面:

(1) 微塑料本身对水产品质量安全的影响。目前,食用贻贝、牡蛎等贝类体内均有大量微塑料存在(Li *et al.*, 2018; Renzi *et al.*, 2018),是人类从海产品中摄入微塑料的主要来源。与食用鱼类不同,人类食用贝类时通常不会去除内脏,这种饮食习惯会大大增加人类对微塑料的摄入量(Wallace *et al.*, 2016)。据估算,人类每食用 225 g 贻贝组织,同时会摄入约 900 个微塑料(Li *et al.*, 2015),每人每年因食用贝类而摄入微塑料的数量可达 11000 个(van Cauwenberghe *et al.*, 2014),进而推测食用被微塑料污染的海产品可能会危害人体健康。但与日常生活中进入体内的微塑料数量相比,通过食用贻贝摄入微塑料的数量相对较少(Catarino *et al.*, 2018)。

(2) 微塑料释放添加剂及携带有毒污染物的风险。已有研究发现,微塑料中污染物的暴露剂量很小,通过饮食摄入微塑料而接触的 PAHs 占 0.02%~0.1%, PCBs 占 0.007%~0.03%, DDT 占 0.0000002%~0.004%,而添加剂的暴露剂量更少, BPA 占 0.000005%~0.00002%, PBDEs 占 0.0007%~0.003% (Lusher *et al.*, 2017),这表明微塑料释放添加剂及携带有毒污染物对水产品质量安全影响的风险较小。

(3) 微塑料携带病原微生物的风险。被微塑料污染的水产品,可能会携带病原生物(如海洋弧菌等),当处理和食用这些水产品时,就可能引起人体感染发病。目前尚无相关研究报道证实这一推测,但仍然需要引起人们对水产品质量安全的高度重视。

7 结语与展望

微塑料作为一种新型的海洋污染物,受到国内外的高度关注。当前研究表明,微塑料被海洋渔业生物摄入后,会抑制其生长发育、摄食及行为能力,并引起生殖毒性、免疫毒性、遗传损伤等毒性效应。此外,微塑料沿着海洋食物链传递,可能会增加其在高营养级生物体内的富集量,产生生物放大作用,最终影响海洋生态系统结构和功能的稳定。尽管已经开展了相关实验予以佐证,但目前所获得的实验数据还未能有力证实微塑料会对人类健康产生负面影响。从研究现状来看,未来还存在诸多问题需要解决:

(1) 海洋渔业水域微塑料的源解析。采集常见的的生活或者工业塑料样品,分析其密度、化学添加剂和成分等稳定的关键性参数;构建不同生产、使用和排放途径的塑料指纹信息库;通过比对海水样品与可能来源的塑料样品化学特征库,最后结合多元统计和贝叶斯分析方法,识别不同海洋渔业水域中微塑料污染

的主要来源,为我国海洋渔业水域微塑料污染的监管提供技术支持。

(2) 微塑料的复合毒性效应和载体作用研究。微塑料与环境污染物的复合毒性可能已经超过微塑料自身的物理损伤,需要加强微塑料对环境污染物的吸附/解吸过程的研究,揭示其联合致毒机制。此外,微塑料作为病原微生物的载体传播病害,其对海洋渔业资源的潜在风险尚未进行深入研究,今后应推进相关实验的开展。

(3) 微塑料的海洋生态风险评估。目前,在有关微塑料毒性效应的研究中,多采用微塑料标准品为研究对象,且实验中的暴露剂量远高于环境浓度,还存在暴露时间短、无法满足长期暴露研究需求的局限,这些不足导致了目前的研究工作并不能真实、准确、客观地评价现实环境中微塑料的生态风险,因此,应当加强环境特征微塑料在环境浓度下对海洋生物长期暴露的毒性效应研究。

参 考 文 献

- Avio CG, Gorbi S, Milan M, *et al.* Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environmental Pollution*, 2015a, 198: 211–222
- Avio CG, Gorbi S, Regoli F. Experimental development of a new protocol for extraction and characterization of microplastics in fish tissues: First observations in commercial species from Adriatic Sea. *Marine Environmental Research*, 2015b, 111: 18–26
- Bakir A, Rowland SJ, Thompson RC. Transport of persistent organic pollutants by microplastics in estuarine conditions. *Estuarine Coastal & Shelf Science*, 2014, 140(3): 14–21
- Ballent A, Pando S, Purser A, *et al.* Modelled transport of benthic marine microplastic pollution in the Nazaré Canyon. *Biogeosciences*, 2013, 10(12): 7957–7970
- Ballent A, Pando S, Purser A, *et al.* Physical transport properties of marine microplastic pollution. *Biogeosciences Discuss*, 2012, 9(12): 18755–18798
- Barboza L, Gimenez B. Microplastics in the marine environment: Current trends and future perspectives. *Marine Pollution Bulletin*, 2015, 97(1–2): 5–12
- Barboza L, Vieira LR, Branco V, *et al.* Microplastics cause neurotoxicity, oxidative damage and energy-related changes and interact with the bioaccumulation of mercury in the European seabass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquatic Toxicology*, 2018, 195: 49–57
- Batel A, Linti F, Scherer M, *et al.* Transfer of benzo[a]pyrene from microplastics to *Artemia nauplii* and further to zebrafish via a trophic food web experiment: CYP1A induction and visual tracking of persistent organic pollutants. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 2016, 35(7):

- 1656–1666
- Besseling E, Wang B, Lurling M, *et al.* Nanoplastic affects growth of *S. obliquus* and reproduction of *D. magna*. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(20): 12336–12343
- Besseling E, Wegner A, Foekema EM, *et al.* Effects of microplastic on fitness and PCB bioaccumulation by the lugworm *Arenicola marina* (L.). *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(1): 593–600
- Bour A, Haarr A, Keiter S, *et al.* Environmentally relevant microplastic exposure affects sediment-dwelling bivalves. *Environmental Pollution*, 2018, 236: 652–660
- Browne MA, Dissanayake A, Galloway TS, *et al.* Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(13): 5026–5031
- Carbery M, O'Connor W, Palanisami T. Trophic transfer of microplastics and mixed contaminants in the marine food web and implications for human health. *Environment International*, 2018, 115: 400–409
- Carson HS, Nerheim MS, Carroll K A, *et al.* The plastic-associated microorganisms of the North Pacific Gyre. *Marine Pollution Bulletin*, 2013, 75(1–2): 126–132
- Castro RO, Silva ML, Marques M, *et al.* Evaluation of microplastics in Jurujuba Cove, Niteroi, RJ, Brazil, an area of mussels farming. *Marine Pollution Bulletin*, 2016, 110(1): 555–558
- Catarino AI, Macchia V, Sanderson WG, *et al.* Low levels of microplastics (MP) in wild mussels indicate that MP ingestion by humans is minimal compared to exposure via household fibres fallout during a meal. *Environmental Pollution*, 2018, 237: 675–684
- Cedervall T, Hansson LA, Lard M, *et al.* Food chain transport of nanoparticles affects behaviour and fat metabolism in fish. *PLoS One*, 2012, 7(2): e32254
- Chae Y, An YJ. Effects of micro- and nanoplastics on aquatic ecosystems: Current research trends and perspectives. *Marine Pollution Bulletin*, 2017, 124(2): 624–632
- Chen M, Jin M, Tao P, *et al.* Assessment of microplastics derived from mariculture in Xiangshan Bay, China. *Environmental Pollution*, 2018, 242(Pt B): 1146–1156
- Chen QQ, Yang SY, Hollert H, *et al.* The ecotoxicity and carrier function of microplastics in the aquatic environment. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2018, 13(1): 16–30 [陈启晴, 杨守业, Hollert H, 等. 微塑料污染的水生生态毒性与载体作用. *生态毒理学报*, 2018, 13(1): 16–30]
- Christaki U, Dolan JR, Pelegri S, *et al.* Consumption of picoplankton-size particles by marine ciliates: Effects of physiological state of the ciliate and particle quality. *Limnology & Oceanography*, 1998, 43(3): 458–464
- Cole M, Lindeque P, Fileman E, *et al.* Microplastic ingestion by zooplankton. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(12): 6646–6655
- Cole M, Lindeque P, Fileman E, *et al.* The impact of polystyrene microplastics on feeding, function and fecundity in the marine copepod *Calanus helgolandicus*. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(2): 1130
- Dantas DV, Barletta M, de Costa MF. The seasonal and spatial patterns of ingestion of polyfilament nylon fragments by estuarine drums (Sciaenidae). *Environmental Science & Pollution Research*, 2012, 19(2): 600–606
- Desforges JP, Galbraith M, Dangerfield N, *et al.* Widespread distribution of microplastics in subsurface seawater in the NE Pacific Ocean. *Marine Pollution Bulletin*, 2014, 79(1–2): 94–99
- Detree C, Gallardo-Escarate C. Single and repetitive microplastics exposures induce immune system modulation and homeostasis alteration in the edible mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 83: 52–60
- Detree C, Gallardo-Escarate C. Polyethylene microbeads induce transcriptional responses with tissue-dependent patterns in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Molluscan Studies*, 2017, 83(2): 220–225
- Doyle MJ, Watson W, Bowlin NM, *et al.* Plastic particles in coastal pelagic ecosystems of the Northeast Pacific Ocean. *Marine Environmental Research*, 2011, 71(1): 41–52
- Dris R, Gasperi J, Saad M, *et al.* Synthetic fibers in atmospheric fallout: A source of microplastics in the environment. *Marine Pollution Bulletin*, 2016, 104(1–2): 290–293
- Eriksen M, Maximenko N, Thiel M, *et al.* Plastic pollution in the South Pacific subtropical gyre. *Marine Pollution Bulletin*, 2013, 68(1–2): 71–76
- Espinosa C, García Beltrán JM, Esteban MA, *et al.* In vitro effects of virgin microplastics on fish head-kidney leucocyte activities. *Environmental Pollution*, 2018, 235: 30–38
- FAO. The state of world fisheries and aquaculture. Rome: FAO, 2014: 4–37
- Farrell P, Nelson K. Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). *Environmental Pollution*, 2013, 177(4): 1–3
- Ferreira P, Fonte E, Soares ME, *et al.* Effects of multi-stressors on juveniles of the marine fish *Pomatoschistus microps*: Gold nanoparticles, microplastics and temperature. *Aquatic Toxicology*, 2016, 170: 89–103
- Florence AT, Hussain N. Transcytosis of nanoparticle and dendrimer delivery systems: evolving vistas. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, 50(10): S69–S89
- Frias JP, Otero V, Sobral P. Evidence of microplastics in samples of zooplankton from Portuguese coastal waters. *Marine Environmental Research*, 2014, 95(Apr.): 89–95
- Galloway TS, Lewis CN. Marine microplastics spell big problems for future generations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(9): 2331
- Glagani F. Neustonic microplastic and zooplankton in the North Western Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 2012, 64(4): 861–864

- Granby K, Rainieri S, Rasmussen RR, *et al.* The influence of microplastics and halogenated contaminants in feed on toxicokinetics and gene expression in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Environmental Research*, 2018, 164: 430–443
- Guvan O, Bach L, Munk P, *et al.* Microplastic does not magnify the acute effect of PAH pyrene on predatory performance of a tropical fish (*Lates calcarifer*). *Aquatic Toxicology*, 2018, 198: 287–293
- Hall NM, Berry KLE, Rintoul L, *et al.* Microplastic ingestion by scleractinian corals. *Marine Biology*, 2015, 162(3): 725–732
- Hamer J, Gutow L, Kohler A, *et al.* Fate of microplastics in the marine isopod *Idotea emarginata*. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(22): 13451–13458
- Han L, Wang B. The application of bisphenol A in food packaging materials safety research progress. *Green Packaging*, 2016(9): 37–40, 44 [韩林, 王斌. 双酚 A 在食品包装材料中的应用安全研究进展. *绿色包装*, 2016(9): 37–40, 44]
- He L, Huang FJ, Yin KD. The ecological effect of marine microplastics as a biological vector. *Journal of Tropical Oceanography*, 2018, 37(4): 1–8 [何蕾, 黄芳娟, 殷克东. 海洋微塑料作为生物载体的生态效应. *热带海洋学报*, 2018, 37(4): 1–8]
- Jabeen K, Su L, Li J, *et al.* Microplastics and mesoplastics in fish from coastal and fresh waters of China. *Environmental Pollution*, 2017, 221(Feb.): 141–149
- Jambeck JR, Geyer R, Wilcox C, *et al.* Marine pollution. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, 2015, 347(6223): 768–771
- Jani PU, McCarthy DE, Florence AT. Nanosphere and microspheres uptake via Peyer's patches: Observation of the rate of uptake in the rat after a single oral dose. *International Journal of Pharmaceutics*, 1992, 86(2): 239–246
- Jiang PL, Zhao SY, Zhu LX, *et al.* Microplastic-associated bacterial assemblages in the intertidal zone of the Yangtze Estuary. *Science of the Total Environment*, 2018, 624: 48–54
- Jeong CB, Kang HM, Lee MC, *et al.* Adverse effects of microplastics and oxidative stress-induced MAPK/Nrf2 pathway-mediated defense mechanisms in the marine copepod *Paracyclops nana*. *Scientific Reports*, 2017, 7: 41323
- Jeong CB, Kang HM, Lee YH, *et al.* Nanoplastic ingestion enhances toxicity of persistent organic pollutants (POPs) in the monogonont rotifer *Brachionus koreanus* via multixenobiotic resistance (MXR) disruption. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52, 11411–11418
- Kaposi KL, Mos B, Kelaher BP, *et al.* Ingestion of microplastic has limited impact on a marine larva. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(3): 1638–1645
- Kazmiruk TN, Kazmiruk VD, Bendell LI. Abundance and distribution of microplastics within surface sediments of a key shellfish growing region of Canada. *PLoS One*, 2018, 13(5): e196005
- Kirstein IV, Kirmizi S, Wichels A, *et al.* Dangerous hitchhikers? Evidence for potentially pathogenic *Vibrio* spp. on microplastic particles. *Marine Environmental Research*, 2016, 120: 1–8
- Lamb JB, Willis BL, Fiorenza EA, *et al.* Plastic waste associated with disease on coral reefs. *Science*, 2018, 359(6374): 460
- Law KL, Moret-Ferguson S, Maximenko NA, *et al.* Plastic accumulation in the North Atlantic subtropical gyre. *Science*, 2010, 329(5996): 1185–1188
- Lebreton L, van der Zwet J, Damsteeg JW, *et al.* River plastic emissions to the world's oceans. *Nature Communications*, 2017, 8: 15611
- Lechner A, Keckeis H, Lumesberger-Loisl F, *et al.* The Danube so colourful: A potpourri of plastic litter outnumbers fish larvae in Europe's second largest river. *Environmental Pollution*, 2014, 188(100): 177–181
- Lee KW, Shim WJ, Kwon OY, *et al.* Size-dependent effects of micro polystyrene particles in the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(19): 11278–11283
- Li J, Green C, Reynolds A, *et al.* Microplastics in mussels sampled from coastal waters and supermarkets in the United Kingdom. *Environmental Pollution*, 2018, 241: 35–44
- Li J, Yang D, Li L, *et al.* Microplastics in commercial bivalves from China. *Environmental Pollution*, 2015, 207: 190–195
- Liboiron M, Liboiron F, Wells E, *et al.* Low plastic ingestion rate in Atlantic cod (*Gadus morhua*) from Newfoundland destined for human consumption collected through citizen science methods. *Marine Pollution Bulletin*, 2016, 113(1–2): 428–437
- Liu Q, Xu XD, Huang W, *et al.* Research advances on the ecological effects of microplastic pollution in the marine environment. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, 37(22): 7397–7409 [刘强, 徐旭丹, 黄伟, 等. 海洋微塑料污染的生态效应研究进展. *生态学报*, 2017, 37(22): 7397–7409]
- Lusher A, Hollman P, Mendoza J. Microplastics in fisheries and aquaculture: Status of knowledge on their occurrence and implications for aquatic organisms and food safety. Rome: FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. No. 615, 2017
- Lusher AL, Burke A, O'Connor I, *et al.* Microplastic pollution in the Northeast Atlantic Ocean: Validated and opportunistic sampling. *Marine Pollution Bulletin*, 2014, 88(1–2): 325–333
- Lusher AL, Mchugh M, Thompson RC. Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel. *Marine Pollution Bulletin*, 2013, 67(1–2): 94–99
- Macfadyen G, Huntington T, Cappell R. Abandoned, lost or otherwise discarded fishing gear. FAO Fisheries & Aquaculture Technical Paper, No. 523. 2009, 115
- Marques-Santos LF, Grassi G, Bergami E, *et al.* Cationic

- polystyrene nanoparticle and the sea urchin immune system: biocorona formation, cell toxicity, and multixenobiotic resistance phenotype. *Nanotoxicology*, 2018: 1–21
- Masó M, Garcés E, Pagès F, *et al.* Drifting plastic debris as a potential vector for dispersing harmful algal bloom (HAB) species. *Scientia Marina*, 2003, 67(1): 107–111
- Mathalon A, Hill P. Microplastic fibers in the intertidal ecosystem surrounding Halifax Harbor, Nova Scotia. *Marine Pollution Bulletin*, 2014, 81(1): 69–79
- Mattsson K, Ekvall MT, Hansson LA, *et al.* Altered behavior, physiology, and metabolism in fish exposed to polystyrene nanoparticles. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(1): 553–561
- Mizraji R, Ahrendt C, Perez-Venegas D, *et al.* Is the feeding type related with the content of microplastics in intertidal fish gut? *Marine Pollution Bulletin*, 2017, 116(1–2): 498–500
- Moore CJ, Moore SL, Leecaster MK, *et al.* A comparison of plastic and plankton in the north Pacific central gyre. *Marine Pollution Bulletin*, 2001, 42(12): 1297–1300
- Moore CJ, Moore SL, Weisberg SB, *et al.* A comparison of neustonic plastic and zooplankton abundance in southern California's coastal waters. *Marine Pollution Bulletin*, 2002, 44(10): 1035–1038
- Nobre CR, Santana MFM, Maluf A, *et al.* Assessment of microplastic toxicity to embryonic development of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). *Marine Pollution Bulletin*, 2015, 92(1–2): 99–104
- Oberbeckmann S, Loeder MG, Gerdtz G, *et al.* Spatial and seasonal variation in diversity and structure of microbial biofilms on marine plastics in Northern European waters. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 90(2): 478–492
- Ogonowski M, Schur C, Jarsen A, *et al.* The effects of natural and anthropogenic microparticles on individual fitness in *Daphnia magna*. *PLoS One*, 2016, 11(5): e155063
- Oliveira M, Ribeiro A, Hylland K, *et al.* Single and combined effects of microplastics and pyrene on juveniles (0+ group) of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). *Ecological Indicators*, 2013, 3: 641–647
- Ory NC, Sobral P, Ferreira JL, *et al.* Amberstripe scad *Decapterus muroadsi* (Carangidae) fish ingest blue microplastics resembling their copepod prey along the coast of Rapa Nui (Easter Island) in the South Pacific subtropical gyre. *Science of the Total Environment*, 2017, 586: 430–437
- Paul-Pont I, Lacroix C, Gonzalez FC, *et al.* Exposure of marine mussels *Mytilus* spp. to polystyrene microplastics: Toxicity and influence on fluoranthene bioaccumulation. *Environmental Pollution*, 2016, 216: 724–737
- Peda C, Caccamo L, Fossi MC, *et al.* Intestinal alterations in European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) exposed to microplastics: Preliminary results. *Environmental Pollution*, 2016, 212: 251–256
- PlasticsEurope. An analysis of European plastics production, demand and waste data. 2018
- Renzi M, Guerranti C, Blašković A. Microplastic contents from maricultured and natural mussels. *Marine Pollution Bulletin*, 2018, 131(Pt A): 248–251
- Rochman CM, Hoh E, Kurobe T, *et al.* Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. *Scientific Reports*, 2013, 3: 3263
- Rochman CM, Kurobe T, Flores I, *et al.* Early warning signs of endocrine disruption in adult fish from the ingestion of polyethylene with and without sorbed chemical pollutants from the marine environment. *Science of the Total Environment*, 2014, 493: 656–661
- Song YK, Hong SH, Jang M, *et al.* Large accumulation of micro-sized synthetic polymer particles in the sea surface microlayer. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(16): 9014–9021
- Sussarellu R, Suquet M, Thomas Y, *et al.* Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113(9): 2430–2435
- Tanaka K, Takada H, Yamashita R, *et al.* Accumulation of plastic-derived chemicals in tissues of seabirds ingesting marine plastics. *Marine Pollution Bulletin*, 2013, 69(1–2): 219–222
- Thompson RC, Olsen Y, Mitchell RP, *et al.* Lost at sea: Where is all the plastic? *Science*, 2004, 304(5672): 838
- Ugolini A, Ungherese G, Ciofini M, *et al.* Microplastic debris in sandhoppers. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 2013, 129(3): 19–22
- UNEP. Marine litter: An analytical review. United Nations Environment Programme, 2005
- United Nations Environment Programme. Marine litter vital graphics of the United Nations Environment Programme and GRID-Arendal. Nairobi: United Nations Environment Programme, 2016
- van Cauwenberghe L, Janssen CR. Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environmental Pollution*, 2014, 193(Oct.): 65–70
- Von Moos N, Burkhardt-Holm P, Kohler A. Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(20): 11327–11335
- Wallace H, Jan A, Lars B., *et al.* Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood. *EFSA Journal*, 2016, 14(6): 4501
- Watts AJ, Lewis C, Goodhead RM, *et al.* Uptake and retention of microplastics by the shore crab *Carcinus maenas*. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(15): 8823–8830
- Wilcox C, Van Sebille E, Hardesty BD. Threat of plastic pollution to seabirds is global, pervasive, and increasing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112(38): 11899–11904
- Witte BD, Devriese L, Bekaert K, *et al.* Quality assessment of

- the blue mussel (*Mytilus edulis*): Comparison between commercial and wild types. *Marine Pollution Bulletin*, 2014, 85(1): 146–155
- Wright SL, Rowe D, Thompson RC, *et al.* Microplastic ingestion decreases energy reserves in marine worms. *Current Biology*, 2013, 23(23): R1031-R1033
- Xu QQ, Zhang G, Zou YD, *et al.* Interactions between microplastics and organic pollutants: Current status and knowledge gaps. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2018(1): 40–49 [徐擎擎, 张哥, 邹亚丹, 等. 微塑料与有机污染物的相互作用研究进展. *生态毒理学报*, 2018(1): 40–49]
- Yin LY, Chen BJ, Xia B, *et al.* Polystyrene microplastics alter the behavior, energy reserve and nutritional composition of marine jacobever (*Sebastes schlegelii*). *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 360: 97–105
- Zettler ER, Mincer TJ, Amaral-Zettler LA. Life in the "plastisphere": Microbial communities on plastic marine debris. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(13): 7137–7146
- Zhang W, Zhang S, Wang J, *et al.* Microplastic pollution in the surface waters of the Bohai Sea, China. *Environmental Pollution*, 2017, 231(Pt 1): 541–548
- Zhao S, Zhu L, Wang T, *et al.* Suspended microplastics in the surface water of the Yangtze Estuary System, China: First observations on occurrence, distribution. *Marine Pollution Bulletin*, 2014, 86(1–2): 562–568
- Zhu L, Bai H, Chen B, *et al.* Microplastic pollution in North Yellow Sea, China: Observations on occurrence, distribution and identification. *Science of the Total Environment*, 2018, 636(15): 20–29

(编辑 冯小花)

Research Progress on Microplastics Pollution in Marine Fishery Water and Their Biological Effects

XIA Bin^{1,2#①}, DU Yushan^{1,3#}, ZHAO Xinguo^{1,2}, ZHU Lin^{1,2},
CHEN Bijuan^{1,2}, SUN Xuemei^{1,2}, QU Keming¹

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

2. Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 3. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract Marine plastic pollution has become a major global environmental issue combined with global climate change, ozone depletion, and ocean acidification. Microplastics (less than 5 mm in diameter), as emergent contaminants, are of great concern globally. Available studies show that microplastics are present in marine fisheries waters, and marine fishery organisms, an important source of high-quality protein for humans, have been contaminated by microplastics. Therefore, the study on microplastics pollution in marine fishery waters and their biological effects has attracted increased attention. In the present study, we summarized the main sources of microplastics in marine fishery waters and their pollution status, summed up the main toxic effects of microplastics on the marine fishery organisms and the corresponding toxicity mechanisms, discussed the transfer of microplastics along the marine food chain and their potential impact on the quality and safety of seafood, analyzed the current problems, and finally, provided the outlook for future work. This study provides a scientific basis for better evaluation of the effect of microplastics on the marine fisheries resources as well as seafood quality and safety.

Key words Microplastics; Marine fisheries; Food chain; Toxic effects; Quality and safety of seafood

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

《渔业科学进展》编辑委员会

THE EDITORIAL BOARD OF *PROGRESS IN FISHERY SCIENCES*

主任委员 Chairman 唐启升 TANG Qisheng

副主任委员 Vice-Chairman 麦康森 MAI Kangsen 桂建芳 GUI Jianfang 金显仕 JIN Xianshi

委 员 Editorial Committee (以姓名笔画为序)

王清印 WANG Qingyin	王鲁民 WANG Lumin	王新鸣 WANG Xinming	戈贤平 GE Xianping
孔 杰 KONG Jie	包振民 BAO Zhenmin	曲克明 QU Keming	任胜民 (新西兰)REN Shengmin
危起伟 WEI Qiwei	庄 平 ZHUANG Ping	刘英杰 LIU Yingjie	关长涛 GUAN Changtao
江世贵 JIANG Shigui	严小军 YAN Xiaojun	李 健 LI Jian	李 军 (美国)LI Jun
李来好 LI Laihao	李家乐 LI Jiale	李 琪 LI Qi	杨红生 YANG Hongsheng
肖 放 XIAO Fang	何建国 HE Jianguo	邹桂伟 ZOU Guiwei	宋林生 SONG Linsheng
张士瑾 ZHANG Shicui	张国范 ZHANG Guofan	陈松林 CHEN Songlin	陈 勇 (美国)CHEN Yong
林 洪 LIN Hong	岳根华 (新加坡)YUE Genhua	周永灿 ZHOU Yongcan	赵宪勇 ZHAO Xianyong
俞志明 YU Zhiming	秦 松 QIN Song	秦启伟 QIN Qiwei	徐 跑 XU Pao
徐 皓 XU Hao	黄 捷 HUANG Jie	常亚青 CHANG Yaqing	常剑波 CHANG Jianbo
崔利锋 CUI Lifeng	解绶启 XIE Shouqi	翟毓秀 ZHAI Yuxiu	薛长湖 XUE Changhu

主 编 Editor-in-Chief 金显仕 JIN Xianshi

副 主 编 Associate Editor-in-Chief 李 健 LI Jian 孔 杰 KONG Jie

编辑部主任 Editorial Director 常 青 CHANG Qing

渔 业 科 学 进 展

YUYE KEXUE JINZHAN

(双月刊, 1980年创刊)

第40卷 第3期 2019年6月

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

(Bimonthly, founded in 1980)

Vol.40 No.3 Jun . 2019

主管单位 中华人民共和国农业农村部
主办单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所
中国水产学会
出版单位 科学出版社
地址: 北京东黄城根北街16号, 邮编: 100717
编辑单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所
地址: 青岛市南京路106号 邮编: 266071
电话: 0532-85833580
http://www.yykxjz.cn
E-mail:yykxjz@ysfri.ac.cn
主 编 金显仕
印 刷 青岛国彩印刷有限公司
国内发行 中国邮政集团公司山东省分公司
订 购 全国各地邮政局
国外发行 中国国际图书贸易总公司
地址: 北京339信箱 邮编: 100044

Administrated by Ministry of Agriculture and Rural Affairs,P.R.China
Sponsored by Yellow Sea Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences
China Society of Fisheries
Published by Science Press
Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
Edited by Yellow Sea Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences
Add:106 Nanjing Road,Qingdao,266071,China; Tel: 0532-85833580
http://www.yykxjz.cn; E-mail:yykxjz@ysfri.ac.cn
Editor-in-Chief Jin Xianshi
Printed by Qingdao Guocai Printing Co.,Ltd.
Domestic Distributed by China Post Group Corporation Shandong Branch
Subscription Post Offices All Over China
Overseas Distributed by China International Book Trading
Corporation
P.O.Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号
ISSN 2095-9869
CN 37-1466/S

国内邮发代号: 24-153
国外发行代号: 4578Q
国内外公开发刊

定 价: 40.00元

ISSN 2095-9869

