

生物絮团对仿刺参幼参消化与免疫酶活性的影响

马元庆¹, 李 斌¹, 张秀珍¹, 白艳艳¹, 刘爱英¹, 刘义豪¹, 任利华¹, 王有廷², 孙 珊¹, 王廷军²

(1. 山东省海洋水产研究所 山东省海洋生态修复重点实验室, 山东 烟台 264006;

2. 烟台海益苗业有限公司, 山东 蓬莱 265619)

摘要:水温 18.2 ~ 21.9 °C, 盐度 30 ~ 32, 在室内 200 L 塑料水槽中添加不同的碳源(葡萄糖、蔗糖、玉米淀粉、地瓜粉等)形成生物絮团, 养殖体重(0.9 ± 0.1) g/只的仿刺参(*Apostichopus japonicus*)幼参 2 个月, 探讨水体中的生物絮团对其体内主要消化酶和免疫酶活性的影响。结果表明, 养殖水体中添加淀粉、蔗糖有利于提高幼参体内消化酶(淀粉酶、蛋白酶)的活性。复合碳源组(葡萄糖: 果糖: 蔗糖: 玉米淀粉: 地瓜粉 = 0: 3: 4: 2: 1), 幼参胃蛋白酶活性(10.63 U/mg)显著高于其它组, 复合碳源更利于提高幼参胃蛋白酶活性。复合碳源组(葡萄糖: 果糖: 蔗糖: 玉米淀粉: 地瓜粉 = 1: 2: 4: 1: 2), 幼参体壁中 ALP 活性最高, 为 2.66 U/mg; 而玉米淀粉组中, 幼参体液中 SOD 活性(204.66 U/mg)显著高于其他各试验组($P < 0.05$)。添加碳源后制得的生物絮团可以提高幼参机体的免疫功能。

关键词:生物絮团; 仿刺参; 消化酶; 免疫酶

中图分类号: Q554 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 3075(2013)06 - 0001 - 05

仿刺参(*Apostichopus japonicus*)营养价值高, 具有广阔的商业前景, 市场需求量大, 是中国北方海水养殖的重要种类, 集约化和工厂化养殖迅猛发展(Chen, 2009); 但非自然环境中, 仿刺参对病原微生物的易感性也增加, 病害频繁发生; 同时, 养殖水体中无机氮、有机物积累, 养殖废水排放严重污染环境, 成为仿刺参养殖产业健康与可持续发展的主要瓶颈之一(丁彦文和艾红, 2000; 杨宝圣和宋余凤, 2004)。生物絮团技术是通过向养殖水体中添加有机碳源, 形成以微生物群落为主体的有机和无机团状物(罗亮等, 2011)。适当添加淀粉、蔗糖、谷薯类粗粉等有机碳后, 形成的生物絮团能有效改善水质, 把水体中的氮转化为微生物蛋白(Avnimelech, 2007; Avnimelech & Kochba, 2009)。生物絮团还可以作为水生生物的一种新型饵料, 具有促进生长的作用(李朝兵等, 2012)。

本文研究了在仿刺参基础饲料中添加不同碳源生成的生物絮团对其体内主要消化酶(淀粉酶 AMS、蛋白酶)和免疫酶(碱性磷酸酶 ALP 和超氧化

歧化酶 SOD)的影响, 以期为生物絮团技术在仿刺参养殖中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

仿刺参幼体由山东省烟台海益苗业有限公司提供, 平均体重(0.9 ± 0.1) g/只, 试验于 2012 年 4 - 6 月在该公司进行。

淀粉酶、胃蛋白酶、碱性磷酸酶和超氧化物歧化酶测定试剂盒由南京建成生物工程公司生产, 试验用碳源包括葡萄糖、蔗糖、果糖、玉米淀粉和地瓜粉, 均购于烟台开发区家家悦超市。

1.2 幼参饲养与试验设计

用 200 L 塑料水槽(试验水体为 100 L)制备生物絮团, 试验养殖仿刺参, 密度为 100 头/槽。整个养殖过程中, 水温保持在 18.2 ~ 21.9 °C, 盐度为 30 ~ 32, 24 h 持续充气。每天 9: 00 和 16: 00 按照幼参体重的 2% 和 3% 投喂饲料(维艾多, 青岛)。

有机碳源的选择很大程度上决定了絮团的群落组成、稳定性及净化水质的功能, 因此本试验设计了多种单质碳源和复合碳源配方, 以筛选最佳碳源。共设 9 个试验组(表 1)和 2 个对照组, 每组设置 3 个平行。以 C/N 为 20 计算, 每 3 d 添加 1 次碳源, 连续观察水色、浊度、生物絮团形成速度、状态等。试验组和对照 1 组均每 2 周全量换水 1 次, 对照 2 组同车间生产操作一致, 每 2 d 天全量换水 1 次。

收稿日期: 2013 - 05 - 08

基金项目: 山东省农业重大应用技术创新项目(2011 - 2013); 水生动物营养与饲料“泰山学者”岗位经费(2007 - 2012)。

通讯作者: 张秀珍, 1964 年生, 女, 研究员。E-mail: zxx0535501@126.com

作者简介: 马元庆, 1979 年生, 男, 工程师, 研究方向为海洋化学与生态学。E-mail: erma0402@163.com

表1 仿刺参养殖试验碳源添加分组
Tab.1 Carbon source groups in breeding test of *Apostichopus japonicus*

组号	碳源	添加量/g	复合碳源成分	比例
1	葡萄糖	1.3	/	/
2	蔗糖	1.3	/	/
3	玉米淀粉	1.5	/	/
4	地瓜粉	1.5	/	/
5	复合碳源	1.4	葡萄糖: 果糖: 蔗糖: 玉米淀粉: 地瓜粉	0: 3: 4: 1: 2
6	复合碳源	1.4	葡萄糖: 果糖: 蔗糖: 玉米淀粉: 地瓜粉	1: 2: 4: 1: 2
7	复合碳源	1.4	葡萄糖: 果糖: 蔗糖: 玉米淀粉: 地瓜粉	1: 3: 3: 1: 2
8	复合碳源	1.4	葡萄糖: 果糖: 蔗糖: 玉米淀粉: 地瓜粉	0: 3: 4: 2: 1
9	复合碳源	1.4	葡萄糖: 果糖: 蔗糖: 玉米淀粉: 地瓜粉	1: 2: 3: 1: 3

1.3 酶活性测定

1.3.1 粗酶液制备 取幼参体壁和消化道于研钵中,按幼参各组织重量加入适量生理盐水,在冰水浴中研磨,制备成组织匀浆;用1 mL注射器抽取幼参体腔液,作为粗酶液。10头幼参组织混合后为1个样品,4℃下5 000 r/min离心10 min,取上清液进行酶活性分析。

1.3.2 酶活性测定 采用南京建成生物工程公司生产的试剂盒测定消化道内淀粉酶(AMS)和蛋白酶活性以及体壁内碱性磷酸酶(ALP)活性和体液内超氧化歧化酶(SOD)活性。

淀粉酶活性定义为组织中每1 mg蛋白在37℃与底物作用30 min、水解10 mg淀粉为1个酶活力单位。

蛋白酶活性定义为每1 mg组织蛋白在37℃、每1 min分解蛋白生成1 μg氨基酸相当于1个酶活力单位。

碱性磷酸酶活性定义为每1 g组织蛋白在37℃与基质作用15 min、产生1 mg酚为1个酶活力单位。

超氧化物歧化酶活性定义为每1 mg组织蛋白在1 mL反应液中SOD抑制率达50%时所对应的量为1个酶活力单位。

1.4 数据处理

采用SPSS17.0软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA);采用Duncan多重比较进行差异显著性分析, $P<0.05$ 视为有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 添加不同碳源后的生物絮团形态与结构

养殖试验进行5 d后,5、6、8号复合碳源组水体中可见较大絮状或丝状体,7、9号复合碳源组的絮团少于上述3组;第8天,蔗糖添加组有丝状和絮状体(图1),葡萄糖添加组也有褐色颗粒或絮团形成,

而玉米淀粉添加组和地瓜粉添加组槽底见少量褐色沉淀,6号复合碳源组出现丝状体和颗粒体的量最大。各种碳源形成的生物絮团结构组成类似,主要由细菌、桡足类和线虫组成,或含有极少量海洋微藻。

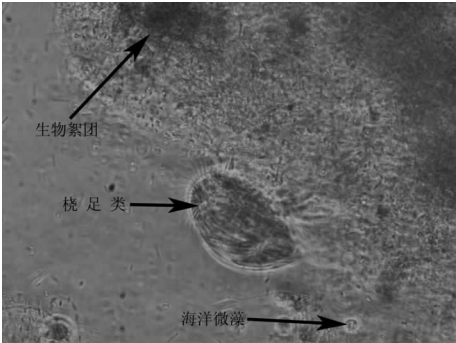


图1 生物絮团的显微观察(×400)

Fig.1 Microscopic observation of flocculent bio-floc

2.2 生物絮团对幼参消化酶活性的影响

3号玉米淀粉添加组幼参消化道中,淀粉酶(AMS)活性显著高于其它处理组和对照组($P<0.05$),高达8.97 U/mg(图2);其次是9号复合碳源组(4.52 U/mg)和8号复合碳源组(4.40 U/mg),其他添加碳源处理组的AMS活性均明显低于2个对照组($P<0.05$);表明饲料中添加淀粉可提高幼参消化道中淀粉酶的活性。

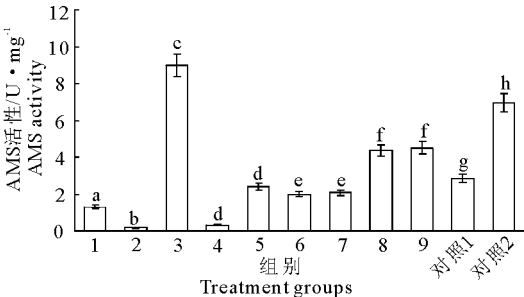


图2 生物絮团对幼参消化道中淀粉酶活性的影响

Fig.2 Effect of bio-floc on AMS activities in digestive tract of juvenile sea cucumber

生物絮团对幼参消化道中胃蛋白酶活性的影响见图3。8号复合碳源组幼参消化道中胃蛋白酶活性(10.63 U/mg)显著高于其它试验组,其次是5号(7.39 U/mg)、6号(5.41 U/mg)和9号(4.14 U/mg),均显著高于2个对照组($P < 0.05$),其它各处理均低于对照组;其中,4号地瓜粉添加组胃蛋白酶的活性最低(0.46 U/mg),其次是2号蔗糖组、1号葡萄糖组和3号玉米淀粉组;可见复合碳源比单质碳源更有利于提高幼参胃蛋白酶活性,而蔗糖和玉米淀粉的效果则优于其它单质碳源。

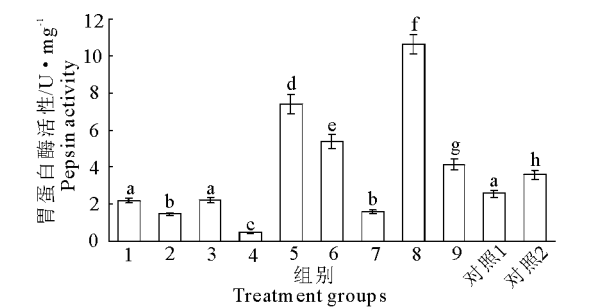


图3 生物絮团对幼参消化道中胃蛋白酶活性的影响
Fig.3 Effect of bio-floc on pepsin activities in digestive tract of juvenile sea cucumber

2.3 生物絮团对幼参免疫酶活性的影响

6号复合碳源组幼参体壁中,碱性磷酸酶(ALP)的活性明显高于其他试验组,达到2.66 U/mg,而其他碳源添加组ALP活性均显著低于对照2组($P < 0.05$)(图4)。其中,3号玉米淀粉组和1号葡萄糖组幼参体壁内ALP活性显著高于对照1组;4号地瓜粉添加组ALP活性最低,仅为0.07 U/mg;表明复合碳源制备的生物絮团提高了幼参体壁内ALP的免疫活性;此外,添加玉米淀粉、葡萄糖培养生成的生物絮团也提高了其ALP活性。

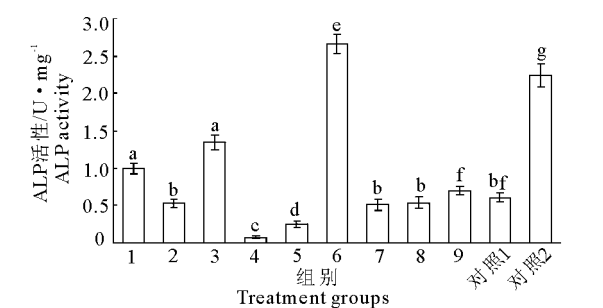


图4 生物絮团对幼参体壁中碱性磷酸酶活性的影响
Fig.4 Effect of bio-floc on ALP activities in body wall of juvenile sea cucumber

3号玉米淀粉添加组幼参体液中超氧化歧化酶(SOD)活性(204.66 U/mg)显著高于其他各试验组,其次为7号复合碳源组(148.66 U/mg)

($P < 0.05$)(图5);其他各碳源添加组SOD活性均高于对照1组,但低于对照2组;表明在饲料中添加碳源培养形成的生物絮团提高了幼参体液内SOD活性,增强了其免疫功能。

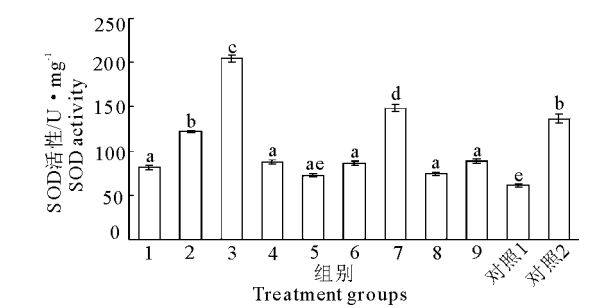


图5 生物絮团对幼参体液中超氧化歧化酶活性的影响
Fig.5 Effect of bio-floc on SOD activities in body fluid of juvenile sea cucumber

3 讨论

3.1 生物絮团养殖技术对幼参消化酶的影响

随着生物体的生长,仿刺参所需要的营养成分发生变化,生长内分泌机能增强,消化酶也发生适应性变化。在饵料中添加能量物质、微生态制剂等对水生动物消化酶活力有较大的影响(叶元土和张勇,1993;Shiau & Yu,1999;Ziaei & Yu,2005;唐黎,2006;丁贤等,2007)。本试验中,玉米淀粉添加组幼参消化道内淀粉酶活性显著高于其他处理组($P < 0.05$),这与肖明松等(2004)的研究结果一致,0.1%的低聚果糖可以显著提高中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)胰脏及后肠的淀粉酶活性。复合碳源组5、6、8、9号幼参消化道内胃蛋白酶活性显著高于2个对照组($P < 0.05$),表明添加的玉米淀粉、蔗糖有利于提高幼参体内主要消化酶(淀粉酶、蛋白酶)的活性,幼参消化与利用淀粉和蛋白质的能力较强。生物絮团养殖技术中的微生物蛋白可以作为饲料蛋白的补充成分,养殖池塘中高蛋白的利用率可以指示水生动物的养殖效率(Avnimelech & Kochba, 2009)。Moss等(2001)研究指出,生物絮团养殖可以提高虾生长所需酶活性的2倍,这些酶包括淀粉酶、蛋白酶、胶原酶、脂肪酶等;龚全等(2007)在奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*)饵料中添加云芝多糖,1.0 g/kg添加组的胃、前肠和中肠蛋白酶活性均显著高于对照组。

3.2 生物絮团养殖技术对幼参免疫酶的影响

ALP是动物体内参与免疫的重要水解酶,能增强血细胞识别异物的功能,在机体免疫中起重要作用。SOD是机体特异性清除活性氧自由基的重要

抗氧化酶,能有效防御抗氧化系统的损伤,维持生物机体平衡。ALP、SOD在仿刺参的体壁防御和体内免疫中发挥着重要作用,其活性变化可以作为评价仿刺参免疫机能状态的重要指标(常杰,2010)。6号复合碳源组幼参体壁内ALP显著高于对照组($P < 0.05$),表明复合碳源添加所产生的生物絮团可能会增强幼参的免疫功能。1号葡萄糖组、3号玉米淀粉组及9号复合碳源组ALP活性高于对照1组,说明产生的微生物絮团在一定程度上刺激了幼参机体免疫功能的提高,表现为ALP活性增加。江晓路等(1999)研究指出,用海藻多糖和北虫草多糖作为饵料添加剂喂养中国对虾(*Penaeus chinensis*),其血清中SOD和酚氧化酶的活性明显提高,具有生物活性的多糖类物质可以刺激对虾机体免疫功能的提高。本文中各试验处理组SOD活性均高于对照1组,表明生物絮团养殖技术中添加的碳源对幼参体内免疫活性具有一定的促进作用;这与朱越雄等(2000)的研究结果相似,其对罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)注射云芝多糖,每隔24 h取样,各组织SOD活性均明显高于对照组。

综上所述,幼参饵料中添加碳源(淀粉、蔗糖)有利于提高其体内主要消化酶(淀粉酶、蛋白酶)的活性,添加碳源制备的生物絮团可以刺激幼参机体免疫功能的提高;但生物絮团养殖技术作为一个新的研究领域相当复杂,对添加不同碳源形成生物絮团的摄食效率及生物絮团的不同组成与比例对幼参生长与产量影响,还需要更深入的研究。

参考文献

常杰. 2010. 对虾和刺参敏感免疫学指标的筛选和评价[D]. 青岛:中国海洋大学.

丁贤,李卓佳,陈永青,等. 2007. 复合中草药对凡纳滨对虾生长和消化酶活力的影响[J]. 广东海洋大学学报,27(1):22-26.

丁彦文,艾红. 2000. 微生物在水产养殖中的应用[J]. 湛江海洋大学学报,20(1):68-73.

龚全,许国焕,付天玺. 2007. 云芝多糖对奥尼罗非鱼消化机能的影响[J]. 饲料工业,28(20):21-23.

江晓路,刘树青,张朝晖,等. 1999. 多糖对中国对虾免疫功能的影响[J]. 中国水产科学,6(1):66-68.

李朝兵,王广军,余德光,等. 2012. 生物絮团对鳙生长、肌肉氨基酸成分及营养评价的影响[J]. 江苏农业科学,11(40):242-245.

罗亮,张家松,李卓佳. 2011. 生物絮团技术特点及其在对虾养殖中的应用[J]. 水生态学杂志,32(5):129-134.

唐黎. 2006. 刺参不同季节和发育时期酶活力与消化道形态结构的研究[D]. 大连:大连水产学院.

肖明松,王志耕,孙玉军,等. 2004. 饲料中添加果寡糖和糖茹素对中华鳖消化酶活力的影响[J]. 中国畜牧兽医,31(2):10-14.

杨宝圣,宋余凤. 2004. 养殖自身污染不可忽视[J]. 中国水产,(2):50.

叶元土,张勇. 1993. 酶制剂EA-II和生物制剂BA-I对鲤肠道、肝胰脏的蛋白酶和淀粉酶活力的影响[J]. 大连水产学院学报,8(1):79-82.

朱越雄,魏育红,贡成良. 2000. 罗氏沼虾两种抗氧化酶活性与云芝多糖的影响[J]. 内陆水产,(7):6-7.

Avnimelech Y, Kochba M. 2009. Evaluation of nitrogen uptake and excretion by tilapia in biofloc tanks, using N tracing[J]. Aquaculture, 287: 163-168.

Avnimelech Y. 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds[J]. Aquaculture, 264: 140-147.

Chen X R. 2009. Studies on high performance immunostimulants for white shrimp *Litopenaeus vannamei* and sea cucumber *Apostichopus japonicus*[D]. Qingdao: Ocean University of China.

Moss S M, Divakaran S, Kim B G. 2001. Stimulating effects of pond water on digestive enzyme activity in the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone)[J]. Aquaculture Research, 32(2): 125-131.

Shiau S Y, Yu Y P. 1999. Dietary supplementation of chitin and chitosan depresses growth in tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aeneus*[J]. Aquaculture, 179: 439-446.

Ziaei N S, Habibi R M, Azari T G, et al. 2005. The effect of *Bacillus* spp. Bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*[J]. Aquaculture, 5: 1-9.

(责任编辑 万月华)

The Effect of Bio-floc on Digestive and Immune Enzymes Activity in Juvenile Sea Cucumber *Apostichopus japonicus*

MA Yuan-qing¹, LI Bin¹, ZHANG Xiu-zhen¹, BAI Yan-yan¹, LIU Ai-ying¹,
LIU Yi-hao¹, REN Li-hua¹, WANG You-ting², SUN Shan¹, WANG Ting-jun²

(1. Shandong Key Lab of Marine Ecological Restoration, Shandong Marine Fisheries
Research Institute, Yantai 264006, P. R. China;
2. Yantai Haiyi Aquatic Seeding Co. Ltd, Penglai 265619, P. R. China)

Abstract: In order to discuss the effect of the bio-floc in water on the main digestive and immune enzyme activity, the experiment was conducted with two objects. One was the bio-floc that formed in 200-liter tanks with addition of different carbon sources (glucose, sucrose, corn starch, sweet potato powder and mixtures) with the temperature of 18.2 – 21.9 °C and the salinity of 30 – 32. And another object was the juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* that bred for 2 months with the weight of (0.9 ± 0.1) g. The results showed that adding amylum or sucrose in water body was beneficial to improve the activities of digestive enzyme (including amylase and protease) of juvenile sea cucumber, Pepsin activities in juvenile sea cucumber which fed in compound carbons group (0: 3: 4: 2: 1) were significant higher than other groups. Compared with single carbon, compound carbons may be more beneficial to increase pepsin activities. ALP activities in the body wall of juvenile sea cucumber which fed in compound carbons group (1: 2: 4: 1: 2) were the highest (2.66 U/mg); But in the corn starch group, SOD activities (204.66 U/mg) in the body fluid of juvenile sea cucumber were significant higher than other treatment groups ($P < 0.05$). And the bio-floc that supplemented with carbon sources may enhance the immunity of juvenile sea cucumber.

Key words: bio-floc; *Apostichopus japonicus*; digestive enzymes; immune enzymes