

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2012.01087

微颗粒饲料与冷藏桡足类对大黄鱼稚鱼消化酶活力、 肠和肝脏显微结构的影响

于海瑞^{1,2} 艾庆辉¹ 麦康森¹ 马洪明¹

José Luis Zambonino-Infante³ Chantal Louise Cahu³

(1. 中国海洋大学教育部海水养殖重点实验室, 青岛 266003; 2. 山东省高校生物化学与分子生物学重点实验室(潍坊学院), 潍坊学院生物与农业工程学院, 潍坊 261061; 3. Unité Mixte INRA-IFREMER de Nutrition des Poissons, IFREMER, BP 70, 29280 Plouzané, France)

摘要: 以初始体重(13.80±0.40)mg的大黄鱼(*Pseudosciaena crocea* R.)稚鱼为对象, 在室内系统内进行饲养试验, 研究了新开发的3种微颗粒饲料(Diet 1–Diet 3)、混合饲料(Diet 4: Diet 3和冷藏桡足类)与冷藏桡足类(Diet 5, 对照组)对25—60日龄大黄鱼稚鱼消化酶活力、肠和肝脏显微结构的影响。结果显示, 35和60日龄时, 微颗粒饲料组鱼苗间的胰蛋白酶活力差异不显著($P > 0.05$), 但均较25日龄时高, 而混合组和对照组无显著变化。除对照组鱼苗35日龄时的胰淀粉酶活力显著($P < 0.05$)高于25和60日龄外, 其他各组间均无显著差异。随着鱼苗的生长, 除混合组和对照组外, 各组间鱼苗肠道氨基酸酶和碱性磷酸酶活力均逐渐升高。组织学结果显示, 混合组35日龄鱼苗前中肠黏膜上有大量脂滴, 而其他各组鱼苗则没有。微颗粒饲料组鱼苗肠黏膜褶皱比混合组和对照组多且深, 直肠黏膜上皮细胞中可见脂滴积累, 而对照组鱼苗直肠几乎没有褶皱, 并缺乏脂滴。微颗粒饲料组鱼苗肝细胞内有大量脂滴, 胞核移向细胞外周。混合组鱼苗35日龄时肝细胞内也有脂滴, 但数量在60日龄时减少。对照组鱼苗肝脏中可见类似于饥饿状态的胞间隙、胞质塌陷和胞核固缩。以上结果表明, 合适的微颗粒饲料可促进大黄鱼稚鱼消化道的发育。基于Diet 1效果优于Diet 2和Diet 3, 可将其作为进一步研究大黄鱼稚鱼营养和微颗粒饲料的基础配方。

关键词: 大黄鱼稚鱼; 消化酶活力; 肠道; 肝脏; 显微结构; 微颗粒饲料

中图分类号: S963 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2012)06-1087-10

前面的实验研究了新开发的微颗粒饲料、混合饲料和冷藏桡足类对大黄鱼仔稚鱼生长、成活率和体成分的影响^[1]。然而, 作为传统而直接评价稚鱼用饲料质量的两个指标, 生长和成活率不能反应鱼体内部的变化^[2]。了解消化酶活力的变化规律及肠和肝脏结构的发育过程, 对于评估饲料质量、饲料中营养物质代谢和鱼苗营养状态都是必要的^[3]。研究表明, 饲料组成不同会影响稚鱼消化酶活力变化和肠道的发育进程^[4-6]。此外, 组织学研究已成为评定由饥饿或营养缺乏导致不可逆损伤的可靠方法之一^[7, 8]。

为开发大黄鱼稚鱼用微颗粒饲料, 本实验研究了3种新开发的微颗粒饲料与冷藏桡足类对25—60日龄大黄鱼稚鱼主要消化酶活力、肠道和肝脏发育的影响。其结果可作为辅助信息, 用以探讨微颗粒饲料替代生物饵料的限制性因素并初步筛选适合于大黄鱼稚鱼的饲料配方。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

以经低温干燥处理的白鱼粉、贻贝粉和乌贼内

收稿日期: 2011-08-31; 修订日期: 2012-07-01

基金项目: 国家自然科学基金(30400335); 国家 863 高技术研究发展计划(2004AA603610); 中法合作先进研究计划(PRA BT01-03)资助

作者简介: 于海瑞(1967—), 男, 山东寿光人; 博士; 主要从事动物营养与饲料学研究。E-mail: yhr6003@yahoo.com.cn

通讯作者: 艾庆辉, Tel: 0532-82031943, E-mail: qhai@ouc.edu.cn

脏粉作蛋白源,以大豆磷脂和鳕鱼肝油作脂肪源,以褐藻酸钠作黏合剂,以番茄红(无锡绿谷生物制品有限公司)作饲料着色剂,而甜菜碱和甘氨酸用作诱食剂,并加复合维生素和复合无机盐等配制成3种微颗粒饲料(Diet 1–Diet 3)。微颗粒饲料配方已申请专利,加工方法参照 Blair, *et al.*^[9]。将饲料分别制成250—425 μm (25–45日龄鱼苗)和425—600 μm (45日龄之后鱼苗)大小的颗粒。将 Diet 3 与冷藏桡足类作为混合组(Diet 4)。因活桡足类资源枯竭,周围海域无法捕到,用冷藏桡足类作为对照组(Diet 5)。所有的微颗粒饲料分别用铝箔袋包装并保存于 -20°C 下备用。

1.2 实验用鱼与管理

实验在浙江省象山县象山湾大黄鱼苗种繁育中心进行。实验用鱼为该中心当年3月份人工繁育的第3批25日龄大黄鱼稚鱼。实验开始时挑选规格整齐、体质健壮和活力好的体重为 $(13.80 \pm 0.40)\text{mg}$ 的鱼苗45000尾,随机分成15组,每组3000尾,分别放于15个225 L的红色长方体塑料桶内($80\text{ cm} \times 60\text{ cm} \times 60\text{ cm}$)。所有的桶置于室内一水泥育苗池($800\text{ cm} \times 400\text{ cm} \times 160\text{ cm}$)中,池底设有排水管道,池内装有钢管加热以保持水温。所用海水经室外蓄水池沉淀,二级砂滤池过滤,进育苗池前再经滤袋过滤。实验期间,水温在 $(24 \pm 1)^{\circ}\text{C}$, pH在 (8.0 ± 0.2) ,盐度在 $(27 \pm 3)\text{‰}$ 。每桶内设1个充气石,桶内海水的每天换水量为50%—300%。桶内水表面的光强度在白天维持在1000 lx以下。用PVC管将漂浮在水面的污物及时撇去,用虹吸管将桶底的残余饲料、粪便和死苗及时吸出。

大黄鱼鱼苗自3—20日龄投喂轮虫(其浓度为 $0.5\text{—}1.5 \times 10^4$ 个/L海水)。14—24日龄鱼苗增加投喂丰年虫无节幼体($1.0\text{—}1.5 \times 10^3$ 个/L海水),21—24日龄鱼苗增加投喂冷藏桡足类[$10.0\text{—}20.0\text{ mg}/(\text{ind} \cdot \text{d})$]。用作饵料的轮虫和丰年虫无节幼体投喂前用海洋小球藻、酵母(哈尔滨马利酵母有限公司)和50DE乳化油营养强化剂(山东省海洋水产研究所)二次培养以提高DHA和EPA含量^[10]。轮虫的常规成分为粗蛋白($56.5 \pm 0.2\%$),粗脂肪($14.5 \pm 0.1\%$),灰分($14.7 \pm 0.1\%$)(干物质,平均值 \pm 标准差)。20日龄前,在育苗池内持续提供海洋小球藻,其密度为 $2\text{—}4 \times 10^4$ (细胞数)/mL。

从25日龄起,鱼苗分别投喂实验饲料和冷藏桡足类(Diet 1–Diet 5),每天手工过量投喂5次(6:00、9:00、12:00、15:00和18:00),其中混合组投喂量为 Diet 3 和 Diet 5 的投喂量一半。养殖实验至60日龄结束,共持续5周。

1.3 取样与解剖

于早上投喂之前,随机取25、35和60日龄大黄鱼鱼苗各60尾用于消化酶活力分析。25日龄样品直接取自育苗池中,35和60日龄样品分别取自各实验桶中。样品立即冷冻在液氮里,随后保存于 -80°C 下备用。分析消化酶活力时,按照 Cahu 和 Zambonino Infante^[7]的方法,将鱼苗样品放在 0°C 的冰上,在显微镜下解剖得到所需的胰腺段和肠段。

于早上投喂之前,随机取25、35和60日龄大黄鱼鱼苗各30尾用于光镜观察。25日龄样品直接取自育苗池中,35和60日龄样品分别取自各实验桶中。

1.4 酶活力分析与组织学

酶活力用紫外可见分光光度计(Shimadzu, UV-2401PC)进行分析。先将样品用5倍体积(v/w)的 0°C 的蒸馏水在匀浆器(PT-MR 2100, Polytron, USA)中匀浆,于 4°C 离心($3300\text{ r}/\text{min}$)3min,取上清液备用。胰蛋白酶活力分析参照 Holm, *et al.*^[11]的方法,用 *N* α -Benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide(BAPNA, B-4875, Sigma)作底物。淀粉酶活力参照 Métais 和 Bieth^[12]的方法测定,用碘溶液显示未水解的淀粉(S-9765, Sigma)。参照 Crane, *et al.*^[13]和 Zambonino Infante, *et al.*^[14]的方法,从肠段洗净得到刷状缘膜。亮氨酸氨肽酶(AN)活力的分析参照 Maroux, *et al.*^[15]的方法,用 Leucine-*p*-nitroanilide(L-9125, Sigma)作底物。肠道内碱性磷酸酶(AP)活力分析参照 Bessey, *et al.*^[16]的方法,用 *p*-Nitrophenylphosphate(PNPP, 106850, Merck)作底物。酶活力用比活力表示(mU/mg protein)。蛋白浓度的测定参照 Bradford^[17]的方法,用牛血清蛋白(BSA, A-2153, Sigma)作底物。考虑到胰腺酶活力可作为胰腺合成功能的参数,而肠段酶活力可作为胰腺分泌功能的参数,胰腺酶活力的分泌可表示为肠段酶活力占胰和肠段总酶活力的比例^[18]。

样品用5%的福尔马林(磷酸缓冲液稀释, pH 7.4)固定后,系列酒精脱水,常规石蜡包埋后,用 Leica RM 2135 型切片机切成一系列5—7 μm 厚的连续切片,固定在载玻片上(每张载玻片6—9个切面),用

HE 染色, 光学显微镜下观察并拍照。

1.5 统计方法

实验所得数据用平均值±标准差($n=3$)表示。实验数据用 SPSS 13.0 for windows 软件进行方差分析, 当差异显著($P < 0.05$)时, 再进行 Tukey 多重比较(Tukey HSD test)。

2 结果

2.1 消化酶活力

胰腺消化酶活力 各组大黄鱼鱼苗 35 日龄时的胰蛋白酶活力均较 25 日龄时有升高; 其中, 微颗粒饲料组鱼苗的胰蛋白酶活力有显著升高($P < 0.05$), 但各组之间鱼苗的胰蛋白酶活力差异不显著($P > 0.05$)(表 1)。60 日龄时, 微颗粒饲料组鱼苗的胰蛋白酶活力较高, 但与 35 日龄时差异不显著($P > 0.05$); 混合组鱼苗次之, 而对照组鱼苗的胰蛋白酶活力最低; 混合组和对照组鱼苗的胰蛋白酶活力均较 35 日龄时低, 但差异不显著($P > 0.05$)。

随着鱼苗的生长, 各组鱼苗的胰淀粉酶活力在 35 日龄时升高, 而在 60 日龄时均有下降, 但除对照组外差异均不显著($P > 0.05$)。对照组 35 日龄鱼苗的胰淀粉酶活力较 25 和 60 日龄时有显著提高($P < 0.05$)。

肠道消化酶活力 各组大黄鱼鱼苗 35 日龄时胰蛋白酶分泌能力显著($P < 0.05$)高于 25 日龄, 但各组之间差异不显著(表 2)。随着鱼苗生长, 除对照组胰蛋白酶分泌能力显著($P < 0.05$)低于 35 日龄时外, 其他各组均无显著变化($P > 0.05$)。随着鱼苗生长, 胰淀粉酶分泌能力逐渐升高, 但在 35 日龄时与 25 日龄时相比差异不显著($P > 0.05$)。60 日龄时, 微颗粒饲料组鱼苗的胰淀粉酶分泌能力较高, 混合组次之, 而对照组最低; 除对照组外, 各组胰淀粉酶分泌能力均较前有显著升高。

各组大黄鱼鱼苗肠段及其刷状缘亮氨酸氨肽酶活力的变化趋势与胰淀粉酶的变化相似(表 3)。

35 日龄时, 各组鱼苗肠段和肠刷状缘碱性磷酸

表 1 各处理组不同日龄大黄鱼稚鱼胰腺胰蛋白酶活力(mU/mg 蛋白)和胰淀粉酶活力(U/mg 蛋白)

Tab. 1 Trypsin specific activities (mU/mg protein) and amylase specific activities (U/mg protein) in the pancreatic segments of large yellow croaker larvae fed with the experimental diets at different days after hatching (DAH)

Diets	Diet 1	Diet 2	Diet 3	Diet 4	Diet 5
胰蛋白酶活力 Trypsin specific activities					
25 DAH	13.98 ± 2.48 ^Y	13.98 ± 2.48 ^Y	13.98 ± 2.48 ^Y	13.98 ± 2.48	13.98 ± 2.48
35 DAH	22.99 ± 6.92 ^X	19.82 ± 2.42 ^X	20.09 ± 4.27 ^X	20.61 ± 7.22	17.66 ± 5.12
60 DAH	23.04 ± 3.62 ^{aX}	20.11 ± 10.05 ^{aXY}	20.80 ± 3.35 ^{aX}	17.47 ± 7.40 ^{ab}	10.06 ± 1.67 ^b
胰淀粉酶活力 Amylase specific activities					
25 DAH	0.76 ± 0.22	0.76 ± 0.22	0.76 ± 0.22	0.76 ± 0.22	0.76 ± 0.22 ^Y
35 DAH	0.97 ± 0.16	1.00 ± 0.41	0.91 ± 0.22	1.13 ± 0.33	1.08 ± 0.08 ^X
60 DAH	0.89 ± 0.21	0.93 ± 0.10	0.83 ± 0.25	0.84 ± 0.37	0.69 ± 0.23 ^Y

注: 表中数据表示为平均值±标准差($n=3$); 对于同一种酶, 同一行中相同的上标小写字母和同一列中相同的上标大写字母表示差异不显著($P > 0.05$); 下同。

Note: Values are expressed as means ± SD ($n=3$); for each pancreatic enzyme, the same superscript small letter in the same row and the same superscript capital letter in the same column are not significantly different as determined by Tukey's test ($P > 0.05$); the same applies below.

表 2 各处理组不同日龄大黄鱼稚鱼肠道胰蛋白酶和淀粉酶的分泌比例(%)

Tab. 2 Percentage of secreted pancreatic trypsin or amylase in intestinal segment related to total trypsin or amylase in the whole-body of large yellow croaker larvae fed with the experimental diets at different days after hatching (DAH)

Diets	Diet 1	Diet 2	Diet 3	Diet 4	Diet 5
胰蛋白酶分泌比例 Percentage of secreted trypsin (%)					
25 DAH	31.49 ± 4.94 ^Y	31.49 ± 4.94 ^Y	31.49 ± 4.94 ^Y	31.49 ± 4.94 ^Y	31.49 ± 4.94 ^Y
35 DAH	45.42 ± 5.09 ^X	47.62 ± 8.37 ^X	43.76 ± 3.00 ^X	42.10 ± 6.08 ^X	48.14 ± 5.93 ^X
60 DAH	43.57 ± 11.89 ^{XY}	39.56 ± 14.31 ^{XY}	42.36 ± 7.13 ^X	41.61 ± 5.56 ^X	37.59 ± 2.98 ^Y
胰淀粉酶分泌比例 Percentage of secreted amylase (%)					
25 DAH	52.98 ± 7.85 ^Y	52.98 ± 7.85 ^Y	52.98 ± 7.85 ^Y	52.98 ± 7.85 ^Y	52.98 ± 7.85
35 DAH	58.47 ± 5.82 ^Y	61.68 ± 4.99 ^Y	60.80 ± 4.05 ^Y	62.53 ± 5.96 ^Y	59.47 ± 2.01
60 DAH	83.10 ± 3.53 ^{aX}	82.22 ± 2.21 ^{aX}	83.46 ± 2.48 ^{aX}	75.41 ± 6.05 ^{abX}	62.26 ± 7.18 ^b

酶活力均无显著差异($P > 0.05$), 但与25日龄时相比均有显著升高($P < 0.05$)(表4)。60日龄时, 微颗粒饲料组鱼苗的肠碱性磷酸酶活力显著高于另外两组($P < 0.05$); 除混合组和对照组外鱼苗肠碱性磷酸酶活力均较前有显著升高($P < 0.05$); Diet 1组鱼苗肠刷状缘碱性磷酸酶活力显著升高($P < 0.05$), 其他各组之间则无显著变化($P > 0.05$)。

2.2 肠道和肝脏组织学结构

肠道结构 25日龄时, 大黄鱼鱼苗前肠的黏膜褶皱较深, 并分布有大量的脂肪泡(图版 I-1)。35日龄时, 混合组鱼苗前肠黏膜与25日龄时相似, 分布有丰富的脂肪泡, 而其他处理组鱼苗的前肠上皮上则无脂肪泡的积聚(图版 I-2—6)。此外, 35日龄时, 各组鱼苗前肠的黏膜褶皱与25日龄时比较, 没有明显的变化。然而, 60日龄时, 微颗粒饲料组鱼苗前肠的黏膜褶皱发育良好(图版 I-7—9); 相反, 混合组和对照组鱼苗前肠的黏膜褶皱较少、较短(图版 I-10、11)。在整个实验期间, 除了未见脂肪泡外, 各组鱼苗中肠上皮的特征与前肠相似。

25日龄时, 大黄鱼鱼苗直肠的黏膜褶皱多而深,

上皮内有大量的脂肪泡(图版 I-12)。35日龄时, 各组鱼苗直肠的黏膜褶皱与25日龄时相似(图版 I-13—15)。60日龄时, Diet 1和Diet 2组鱼苗直肠的黏膜褶皱比Diet 3组鱼苗多且深(图版 II-18—20)。而随着鱼苗的生长发育, 直肠的黏膜褶皱顶端的空泡状吸收细胞不断增多(图 3a-d 和图版 II-18—20)。混合组鱼苗直肠的黏膜褶皱35日龄时较25日龄时浅(图版 II-16), 但在60日龄时稍微恢复(图版 II-21); 此外, 混合组鱼苗直肠黏膜上皮顶端空泡状吸收细胞的数量没有明显变化。然而, 对照组鱼苗直肠几乎没有黏膜褶皱, 上皮细胞萎缩并缺少空泡状吸收细胞(图版 II-17、22)。

肝脏结构 25日龄时, 大黄鱼鱼苗肝脏的肝细胞胞体较大, 胞核较大, 位于细胞中央, 呈球状, 核仁明显, 细胞质中可见多角形的脂滴(图版 II-23)。

35日龄时, 微颗粒饲料组鱼苗的肝脏具有相似的组织学特征, 胞核形状均一, 但移向肝细胞的边缘, 而胞质中多角形的脂滴数量与25日龄时相比稍微减少(图版 II-24—26)。混合组鱼苗肝细胞中的脂滴和25日龄时相似, 但胞核体积变大, 形状不规则,

表3 各处理组不同日龄大黄鱼稚鱼肠段和肠刷状缘亮氨酸氨肽酶活力(mU/mg 蛋白)

Tab. 3 Specific activity (mU/mg protein) of leucine-aminopeptidase N (AN) in intestinal segment and in purified brush border membrane of intestine of large yellow croaker larvae fed with the experimental diets at different days after hatching (DAH)

Diets	Diet 1	Diet 2	Diet 3	Diet 4	Diet 5
肠亮氨酸氨肽酶活力 Specific activity of AN in intestinal segment					
25 DAH	27.87 ± 11.42 ^Y	27.87 ± 11.42 ^Y	27.87 ± 11.42 ^Y	27.87 ± 11.42 ^Y	27.87 ± 11.42
35 DAH	41.11 ± 8.97 ^Y	39.27 ± 8.06 ^Y	28.99 ± 11.64 ^Y	33.60 ± 10.45 ^Y	55.37 ± 19.69
60 DAH	63.03 ± 9.09 ^{aX}	65.29 ± 9.76 ^{aX}	57.42 ± 13.76 ^{aX}	53.01 ± 9.79 ^{aX}	25.79 ± 9.62 ^b
肠刷状缘亮氨酸氨肽酶活力 Specific activity of AN in purified brush border membrane of intestine					
25 DAH	81.42 ± 13.92 ^Y	81.42 ± 13.92 ^Y	81.42 ± 13.92 ^Y	81.42 ± 13.92	81.42 ± 13.92 ^Y
35 DAH	113.24 ± 8.65 ^Y	102.85 ± 32.75 ^{XY}	93.44 ± 10.04 ^Y	86.85 ± 12.56	123.14 ± 10.99 ^X
60 DAH	158.75 ± 22.66 ^{aX}	141.15 ± 5.09 ^{aX}	143.59 ± 32.40 ^{abX}	97.56 ± 8.58 ^b	90.48 ± 14.18 ^{bY}

表4 各处理组不同日龄大黄鱼稚鱼肠段和肠刷状缘碱性磷酸酶活力(U/mg 蛋白)

Tab. 4 Specific activity (U/mg protein) of alkaline phosphatase (AP) in intestinal segment and in purified brush border membrane of intestine of large yellow croaker larvae fed with the experimental diets at different days after hatching (DAH)

Diets	Diet 1	Diet 2	Diet 3	Diet 4	Diet 5
肠碱性磷酸酶活力 Specific activity of AP in intestinal segment					
25 DAH	38.63 ± 12.03 ^Z	38.63 ± 12.03 ^Z	38.63 ± 12.03 ^Z	38.63 ± 12.03 ^Y	38.63 ± 12.03 ^Y
35 DAH	83.50 ± 14.32 ^Y	79.32 ± 26.82 ^Y	77.79 ± 14.72 ^Y	86.24 ± 26.26 ^X	73.79 ± 15.35 ^X
60 DAH	131.04 ± 26.09 ^{aX}	139.15 ± 24.50 ^{aX}	116.32 ± 31.46 ^{aX}	68.37 ± 14.51 ^{bXY}	70.05 ± 18.27 ^{bX}
肠刷状缘碱性磷酸酶活力 Specific activity of AP in purified brush border membrane of intestine					
25 DAH	266.49 ± 38.31 ^Z	266.49 ± 38.31 ^Y	266.49 ± 38.31 ^Y	266.49 ± 38.31 ^Y	266.49 ± 38.31 ^Y
35 DAH	531.22 ± 23.12 ^Y	519.01 ± 58.46 ^X	498.96 ± 31.64 ^X	476.83 ± 53.23 ^X	554.58 ± 60.19 ^X
60 DAH	779.32 ± 51.14 ^X	784.49 ± 79.36 ^X	638.11 ± 61.67 ^X	562.36 ± 57.51 ^X	421.25 ± 34.95 ^X

并移向细胞边缘(图版 II-27)。对照组鱼苗肝脏可见一些细胞间隙, 多角形的胞核和少量的脂滴(图版 II-28)。

随着鱼苗的生长, 至 60 日龄时, 微颗粒饲料组鱼苗肝细胞膨胀, 胞质中可见大量形状相似的大球状脂滴, 胞核形状均一但移向细胞周缘(图版 II-29—31)。混合组鱼苗的肝细胞致密, 胞核呈球状, 位于细胞中央, 核仁明显, 胞质内有一些多角形脂滴(图版 II-32)。对照组鱼苗的肝细胞中胞核位于细胞中央, 核仁明显, 胞质内有一些多角形脂滴, 并可见少量细胞间隙存在(图版 II-33)。

3 讨论

胰蛋白酶活力主要受稚鱼发育进程及饲料蛋白水平和氨基酸组成的影响^[2, 19]。在本研究中, 微颗粒饲料组大黄鱼鱼苗的胰淀粉酶活力要高于混合组和冷藏桡足类组, 作者推测可能与微颗粒饲料较高的蛋白水平有关。淀粉酶活力受饲料中糖原和淀粉等碳水化合物组成和含量的影响^[19]。微颗粒饲料组 60 日龄大黄鱼鱼苗的胰淀粉酶活力高于冷藏桡足类组, 这可能与前者较高的淀粉含量有关。各组大黄鱼鱼苗 35 日龄胰蛋白酶的分泌能力较 25 日龄高, 但之后无显著变化; 随着大黄鱼鱼苗的生长, 胰淀粉酶分泌能力逐渐增强, 这与 Ma, *et al.*^[19]的结果一致。此外, 微颗粒饲料组大黄鱼鱼苗的胰蛋白酶和胰淀粉酶分泌能力强于混合组和对照组, 表明前者较后者更适合鱼苗的发育, 这与微颗粒饲料组鱼苗试验后期较快的生长速度和较高的成活率结果相一致。由于饲料中营养物质的组成和水平会影响消化道的发育过程, 胰蛋白酶和胰淀粉酶的分泌能力可作为微颗粒饲料的优劣参数^[20]。

刷状缘的亮氨酸氨肽酶和碱性磷酸酶活力高低是反映稚鱼营养状况的敏感指标, 其急剧升高表明肠道已趋发育成熟^[2, 21]。对大黄鱼^[19]、眼斑拟石首鱼(*Sciaenops ocellatus*)^[22]、狼鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[23]和塞内加尔鲷(*Solea senegalensis*)^[24]等稚鱼的研究表明刷状缘膜酶活力在第 3 周左右急剧升高, 表明肠已具备幼鱼的特征。微颗粒饲料组鱼苗肠段和肠刷状缘亮氨酸氨肽酶和碱性磷酸酶活力逐渐升高, 而混合组和冷藏桡足类组鱼苗的该两种酶活力先升后降, 表明随着大黄鱼鱼苗的生长, 微颗粒饲料逐渐被其适应并促进其肠道发育, 而冷藏桡

足类则不能满足其正常发育的营养需要。这与微颗粒饲料与冷藏桡足类的营养组成和对鱼苗生长的结果相一致。

在本研究中, 用微颗粒饲料饲喂 25 日龄的大黄鱼鱼苗 10d 后, 其肠道的黏膜褶皱没有观察到明显的组织学变化, 这表明由饵料向饲料转换初期对大黄鱼肠道发育有一个适应过程。但是, 投喂微颗粒饲料尤其是 Diet 1 和 Diet 2 两组的大黄鱼鱼苗肠道的黏膜褶皱更多更深, 这表明随着鱼苗的发育, 3 种微颗粒饲料能逐渐满足鱼苗生长需要, 这与生长实验的结果一致。实际上, 肠道的黏膜褶皱长度和上皮细胞高度的增加会使黏膜吸收面积扩大和肠道黏膜层变厚, 进而促进鱼苗的生长^[25]。相反地, 投喂冷藏桡足类的大黄鱼鱼苗肠道的黏膜褶皱变平而数量减少, 反映了鱼苗不良的营养状态, 因为从肠细胞高度的降低可判断稚鱼是否处于饥饿状态^[26]。

在本研究中, 25 日龄的大黄鱼鱼苗前肠上皮内可见脂滴。相似的结果见于 Diaz, *et al.*^[27]研究, 发现隆颈巨额鲷(*Sparus auratus*)稚鱼肠道上皮有脂肪的沉积。该作者认为这种现象可能与轮虫中脂肪酸含量较高而导致不成熟的肠细胞中过量的脂肪不能及时代谢密切相关。Luizi, *et al.*^[28]发现投喂丰年虫无节幼体和桡足类的庸鲈(*Hippoglossus hippoglossus*)稚鱼肠道黏膜中有大量脂滴。Santamaría, *et al.*^[29]在牙鲷(*Dentex dentex* L.)稚鱼的前中肠上皮细胞内均发现了脂滴。然而, 与以上观点不同的是, Deplano, *et al.*^[30]认为, 肠道上皮细胞中脂肪以脂滴的形式沉积与鲈鱼稚鱼投喂丰年虫无节幼体或者人工配合饲料无关, 主要是由于摄食初期, 稚鱼肠细胞合成脂蛋白的能力低造成的。在本研究中, 尽管 3 种微颗粒饲料中脂肪和脂肪酸含量均较高, 但是投喂这 3 种微颗粒饲料的大黄鱼鱼苗前中肠上皮黏膜中没有发现脂滴。此外, 微颗粒饲料组和混合组鱼苗直肠黏膜中发现了大量液泡。相似的结果见于 Gisbert, *et al.*^[3]的报道, 该研究发现饵料中的脂肪含量可能并未超过白鲑(*Coregonus larvaretus* L.)稚鱼肠细胞对脂肪酸的吸收和转运能力, 同时肠道中饵料的快速转移限制了肠腔内营养物质的吸收和利用。而肠道黏膜上脂滴的存在是由于脂肪从肠细胞向血液的转移速度降低造成的^[31]。研究表明, 肠细胞中脂肪的积累不表示机体处于病理状态, 而是当乳糜微粒合成达到饱和状态时脂肪的一种临时贮存形式^[32]。在

本实验中, 冷藏桡足类组大黄鱼鱼苗整个肠段的肠细胞中没有看到脂滴, 这可能与冷藏桡足类的脂肪含量较低有关, 类似于饥饿状态^[33]。

25日龄大黄鱼鱼苗肝细胞中有脂肪积聚。类似地, Luizi, *et al.*^[28]发现饲喂丰年虫无节幼体的庸鲽稚鱼肝细胞中也沉积有大量的脂滴。饲喂微颗粒饲料的大黄鱼鱼苗肝细胞中也有大量的脂滴, 表明脂肪在肝脏中的积聚较多; 此外, 胞核移向细胞边缘, 可能是肝脏对高脂肪含量饲料的一种适应。类似的结果见于 Fontagné, *et al.*^[34]和 Caballero, *et al.*^[35]的研究。这些学者认为肝细胞中存在大量脂滴可能不是一种病理现象, 而是机体对过量脂肪的一种生理反应, 由此推测肝细胞中脂肪的积累反映了鱼类良好的营养水平, 而不是营养代谢的紊乱。

总之, 从本研究中不同处理对大黄鱼鱼苗消化酶活力和组织结构的影响可看出, 合适的微颗粒饲料能促进大黄鱼鱼苗消化道的发育。单独投喂冷藏桡足类会导致鱼苗肠道和肝脏发育不正常, 类似于饥饿状态。这些信息结合生长结果可用来综合评价大黄鱼鱼苗的营养状况。基于 Diet 1 效果优于 Diet 2 和 Diet 3, 可将 Diet 1 作为进一步筛选大黄鱼稚鱼的基础配方。在实际育苗生产上, 为满足大黄鱼鱼苗的快速生长发育的营养需要, 应及时补充优质的微颗粒饲料。

参考文献:

- [1] Yu H R, Mai K S, Ma H M, *et al.* Evaluation of microdiets versus frozen copepods on growth, survival and selected chemical composition of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* larvae [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, **36**(1): 49—56
- [2] Cahu C L, Zambonino-Infante J L. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae [J]. *Aquaculture*, 2001, **200**(2): 161—180
- [3] Gisbert E, Piedrahita R H, Conklin D E. Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices [J]. *Aquaculture*, 2004, **232**(3): 455—470
- [4] Liu X D, Liang M Q, Zhang L M, *et al.* Effect of fish protein hydrolysate levels on growth performance and biological and physiological parameters in tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther, 1873) post-larvae [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(2): 242—249 [柳旭东, 梁萌青, 张利民, 等. 饲料中添加水解鱼蛋白对半滑舌鳎稚鱼生长及生理生化指标的影响. 水生生物学报, 2010, **34**(2): 242—249]
- [5] Han T, Wang J T, Wang Y, *et al.* Effect of different fish protein hydrolysate (FPH) level of dietary supplements on growth and body composition of larvae of cobia (*Rachycentron canadum*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(1): 94—100 [韩涛, 王骥腾, 王勇, 等. 饲料中不同水平鱼蛋白水解物对军曹鱼稚鱼生长及体组成的影响. 水生生物学报, 2010, **34**(1): 94—100]
- [6] Hermansdottir R, Johannsdottir J, Smaradottir H, *et al.* Analysis of effects induced by a pollock protein hydrolysate on early development, innate immunity and the bacterial community structure of first feeding of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, **27**(5): 595—602
- [7] Cahu C L, Zambonino Infante J L. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1994, **109A**(2): 213—222
- [8] Zhang Y Q, Yin J S, Du Y, *et al.* Experimental starvation on *Hucho taimen* and definition of the point of no return [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, **33**(5): 945—950 [张永泉, 尹家胜, 杜伊, 等. 哲罗鱼仔鱼饥饿实验及不可逆生长点的确定. 水生生物学报, 2009, **33**(5): 945—950]
- [9] Blair T, Castell J, Neil S, *et al.* Evaluation of microdiets versus live feeds on growth, survival and fatty acid composition of larval haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) [J]. *Aquaculture*, 2003, **225**(3): 451—461
- [10] Zheng Z Y, Su Y Z, You L, *et al.* Experiment on effects of nutritional-intensified rotifer on growth and survival rate of larval yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* [J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 1996, **15**(Suppl.): 7—10 [郑智莺, 苏跃中, 游岚, 等. 轮虫的营养强化对大黄鱼生长及成活率影响的试验. 台湾海峡, 1996, **15**(增刊): 7—10]
- [11] Holm H, Hanssen L E, Krogdahl A, *et al.* High and low inhibitor soybean meals affect human duodenal proteinase activity differently: *in vivo* comparison with bovine serum albumin [J]. *Journal of Nutrition*, 1988, **118**(4): 515—520
- [12] Métails P, Bieth J. Détermination de l' α -amylase par une microtechnique [J]. *Annales de Biologie Clinique*, 1968, **26**(1—2): 133—142
- [13] Crane R K, Boge G, Rigal A. Isolation of brush border membranes in vesicular form from the intestinal spiral valve of the small dogfish (*Scyliorhinus canicula*) [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1979, **554**(1): 264—267
- [14] Zambonino Infante J L, Cahu C L, Péres A. Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development [J]. *Journal of Nutrition*, 1997, **127**(4): 608—614
- [15] Marous S, Louvard D, Baratti J. The aminopeptidase from hog-intestinal brush border [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1973, **321**(1): 282—295
- [16] Bessey O A, Lowry O H, Brock M J. Rapid coloric method for determination of alkaline phosphatase in five cubic millimeters of serum [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1946,

- 164: 321—329
- [17] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**(2): 248—254
- [18] Ribeiro L, Zambonino Infante J L, Cahu C, *et al.* Digestive enzymes profile of *Solea senegalensis* post larvae fed *Artemia* and a compound diet [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2002, **27**(1): 61—69
- [19] Ma H M, Cahu C L, Zambonino Infante J L, *et al.* Activities of selected digestive enzymes during larval development of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) [J]. *Aquaculture*, 2005, **245**(2): 239—248
- [20] Zambonino-Infante J L, Cahu C L. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2001, **130C**(4): 477—487
- [21] Henning S J. Functional Development of the Gastrointestinal Tract [M]. In: Johnson L R (Eds.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. New York: Raven Press. 1987, 285—300
- [22] Buchet V, Zambonino Infante J L, Cahu C. Variation in activities of some digestive enzymes during larval development of *Sciaenops ocellatus* [A]. In: Creswell L, Harache Y (Eds.), *Island Aquaculture and Tropical Aquaculture*, 4—9 May 1997, Les Trois Ilets, Martinique, Oostende, Belgium [C]. European Aquaculture Society. 1997, 55—56
- [23] Cahu C L, Zambonino-Infante J L. Is the digestive capacity of marine fish larvae sufficient for compound diet feeding? [J]. *Aquaculture International*, 1997, **5**: 151—160
- [24] Ribeiro L, Zambonino-Infante J L, Cahu C L, *et al.* Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858 [J]. *Aquaculture*, 1999, **179**(3): 465—473
- [25] Hall K C, Bellwood D R. Histological effects of cyanide, stress and starvation on the intestinal mucosa of *Pomacentrus coelestis*, a marine aquarium fish species [J]. *Journal of Fish Biology*, 1995, **47**(3): 438—454
- [26] Gisbert E, Doroshov S I. Histology of the developing digestive system and the effect of food deprivation in larval green sturgeon (*Acipenser medirostris*) [J]. *Aquatic Living Resources*, 2003, **16**(2): 77—89
- [27] Díaz J P, Guyot E, Vigier S, *et al.* First events in lipid absorption during post-embryonic development of the anterior intestine in gilthead sea bream [J]. *Journal of Fish Biology*, 1997, **51**(1): 180—192
- [28] Luiz F S, Gara B, Shields R J, *et al.* Further description of the development of the digestive organs in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) larvae, with notes on differential absorption of copepod and *Artemia* prey [J]. *Aquaculture*, 1999, **176**(1): 101—116
- [29] Santamaría C A, Marín de Mateo M, Traveset R, *et al.* Larval organogenesis in common dentex *Dentex dentex* L. (Sparidae): histological and histochemical aspects [J]. *Aquaculture*, 2004, **237**(2): 207—228
- [30] Deplano M, Díaz J P, Connes R, *et al.* Appearance of lipid absorption capacities in larvae of sea bass *Dicentrarchus labrax* during transition to the exotrophic phase [J]. *Marine Biology*, 1991, **108**(3): 361—371
- [31] Salhi M, Hernández-Cruz C M, Bessonart M, *et al.* Effect of different dietary polar lipid levels and different *n-3* HUFA content in polar lipids on gut and liver histological structure of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae [J]. *Aquaculture*, 1999, **179**(2): 253—263
- [32] Leger C. Digestion, absorption and transport of lipids [M]. In: Cowey C B, Mackie A M, Bell G J (Eds.), *Nutrition and Feeding in Fish*. London: Academic Press. 1985, 299—331
- [33] Crespo S, Marín de Mateo M, Santamaría C A, *et al.* Histo-pathological observations during larval rearing of common dentex *Dentex dentex* L. (Sparidae) [J]. *Aquaculture*, 2001, **192**(1): 121—132
- [34] Fontagné S, Geurden Y, Escaffre A M, *et al.* Histological changes induced by dietary phospholipids in intestine and liver of common carp *Cyprinus carpio* L. larvae [J]. *Aquaculture*, 1998, **161**(2): 213—223
- [35] Caballero M J, López-Calero G, Socorro J, *et al.* Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*) [J]. *Aquaculture*, 1999, **179**(2): 277—290

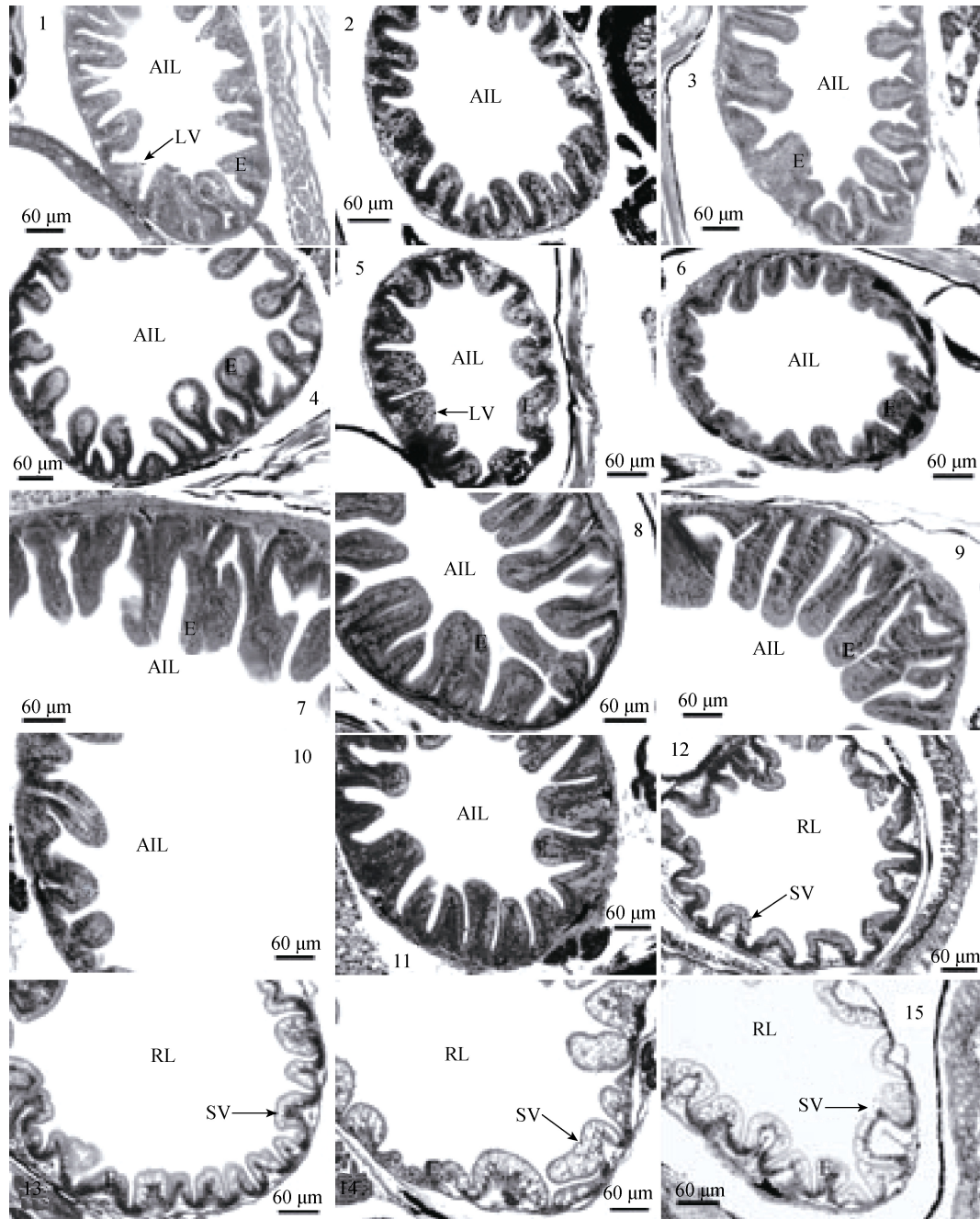
EVALUATION OF MICRODIETS AND FROZEN COPEPODS ON DIGESTIVE ENZYME ACTIVITIES, INTESTINAL AND LIVER MICROSTRUCTURES OF LARGE YELLOW CROAKER (*PSEUDOSCIAENA CROCEA* R.) LARVAE

YU Hai-Rui^{1,2}, AI Qing-Hui¹, MAI Kang-Sen¹, MA Hong-Ming¹,
José Luis Zambonino-Infante³ and Chantal Louise Cahu³

(1. Key Laboratory of Mariculture (Ministry of Education), Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology in Universities of Shandong (Weifang University), College of Biological and Agricultural Engineering, Weifang University, Weifang 261061, China; 3. Unité Mixte INRA-IFREMER de Nutrition des Poissons, IFREMER, BP 70, 29280 Plouzané, France)

Abstract: A feeding trial was conducted to evaluate effects of three newly developed microdiets (MDs: Diet 1–Diet 3), a mixed diet (Diet 4: Diet 3 combined with frozen copepods) and frozen copepods (Diet 5, control) on digestive enzymatic activities, intestine and liver microstructures of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.) larvae, which had an initial mean body weight of (13.80 ± 0.40) mg from 25 to 60 days after hatching (DAH). The results showed that trypsin activities exhibited no significant difference between fish fed with the MDs at 35 and 60 DAH, although those at 25 DAH showed lower trypsin activities, and there was no significant difference between fish fed with mixed diet and frozen copepods. No significant differences were observed between fish fed with the experimental diets except frozen copepods, the latter led to higher amylase activity at 35 DAH than at 25 and 60 DAH. As fish grew older, aminopeptidase N and alkaline phosphatase activities increased in fish fed with the experimental diets except for Diet 4 and Diet 5. No lipid droplets were observed in anterior–mediate intestinal mucosa in 35-day-old fish that were fed with the experimental diets with the exception of the Diet 4. Fish fed with the MDs presented deeper intestinal mucosa folds and supranuclear vacuoles in the rectum, while rectal folds from fish fed with the frozen copepods were nearly flat and lacked supranuclear vacuoles. Fish fed with the MDs displayed numerous lipid vacuoles in hepatocytes with nuclear migration. Liver from fish fed with the mixed diet had numerous lipid vacuoles in hepatocytes with nuclear migration at 35 DAH but such vacuoles decreased at 60 DAH. Liver from fish fed with the frozen copepods resulted in some intercellular spaces, collapsed cytoplasm and pycnotic nuclei of hepatocytes that were similar to starvation condition. These results indicated that suitable MDs could improve the development of digestive system of large yellow croaker larvae. Diet 1 can be used as basal formula for further research on nutrition and MD for large yellow croaker larvae because it was superior to Diets 2 and 3.

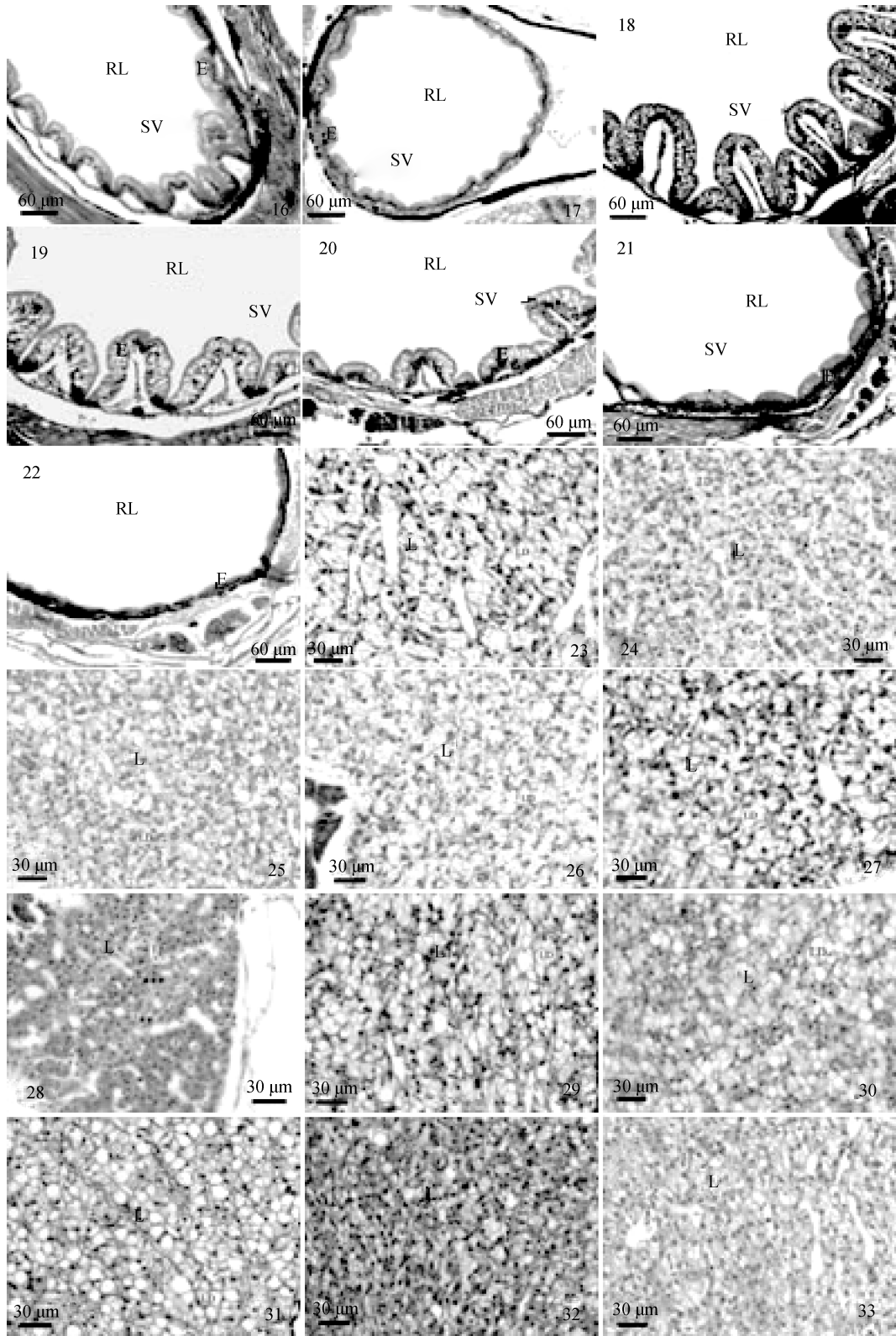
Key words: Large yellow croaker larva; Digestive enzyme activity; Intestine; Liver; Microstructure; Microdiet



图版 I Plate I

1. 25 日龄前肠横切 Cross-section of anterior intestine at 25 DAH; 2—6. 35 日龄 Diet 1—Diet 5 组前肠横切 Cross-section of anterior intestine from Diet 1—Diet 5 groups at 35 DAH; 7—11. 60 日龄 Diet 1—Diet 5 组前肠横切 Cross-section of anterior intestine from Diet 1—Diet 5 groups at 60 DAH; 12. 25 日龄后肠横切 Cross-section of rectum at 25 DAH; 13—15. 35 日龄 Diet 1—Diet 3 组后肠横切 Cross-section of rectum from Diet 1—Diet 3 groups at 35 DAH

AIL. 前肠腔 anterior intestine lumen; E. 上皮 Epithelium; LV. 脂肪泡 lipid vacuoles; RL. 后肠腔 rectal lumen; SV. 亚核液泡 supranuclear vacuoles; DAH. 日龄 days after hatching



图版 II Plate II

16, 17. 35 日龄 Diet 4—Diet 5 组后肠横切 Cross-section of rectum from Diet 4—Diet 5 groups at 35 DAH; 18—22. 60 日龄 Diet 1—Diet 5 组后肠横切 Cross-section of rectum from Diet 1—Diet 5 groups at 60 DAH; 23. 25 日龄肝脏 Liver at 25 DAH; 24—28. 35 日龄 Diet 1—Diet 5 组肝脏 Liver from Diet 1—Diet 5 groups at 35 DAH; 29—33. 60 日龄 Diet 1—Diet 5 组肝脏 Liver from Diet 1—Diet 5 groups at 60 DAH
 E. 上皮 Epithelium; L. 肝脏 liver; RL. 后肠腔 rectal lumen; SV. 亚核液泡 supranuclear vacuoles; LD. 脂滴 lipid droplets; *. 胞间隙 intercellular space; **. 胞质塌陷 collapsed cytoplasm; ***. 胞核固缩 condensed nuclei