

不同C/N生物絮团对洛氏鲮急性铜暴露保护作用

于哲 吴莉芳 李良 朱瑞

PROTECTIVE EFFECTS OF DIFFERENT C/N RATIOS FORMED BIOFLOCS ON ACUTE COPPER EXPOSURE OF *RHYNCHOCYPRIS LAGOWSKII* DYBOWSKI

YU Zhe, WU Li-Fang, LI Liang, ZHU Rui

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2021.2020.046>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

镉暴露诱导黄颡鱼鳃的组织学损伤、氧化应激和免疫反应

CADMIUM EXPOSURE INDUCES HISTOLOGICAL DAMAGE, OXIDATIVE STRESS AND IMMUNE RESPONSE IN YELLOW CATFISH

水生生物学报. 2019, 43(2): 340–347 <https://doi.org/10.7541/2019.042>

镉、汞暴露在中华绒螯蟹卵巢中的富集及其氧化应激反应

EFFECTS OF CADMIUM AND MERCURY ON OXIDATIVE STRESS INDEXES IN THE OVARY OF *ERIOCHEIR SINENSIS*

水生生物学报. 2019, 43(3): 554–562 <https://doi.org/10.7541/2019.067>

不同碳氮比对生物絮团形成及对日本沼虾生长、抗氧化酶和消化酶的影响

EFFECTS OF BIOFLOCS ON GROWTH, DIGESTIVE ENZYMES AND ANTIOXIDANT ENZYMES OF *MACROBRACHIUM NIOONENSE*

水生生物学报. 2020, 44(6): 1239–1246 <https://doi.org/10.7541/2020.144>

饲料蛋白质水平对洛氏生长、非特异性免疫及蛋白质合成的影响

EFFECTS OF DIETARY PROTEIN LEVELS ON THE GROWTH PERFORMANCE, ACTIVITY OF NON-SPECIFIC IMMUNITY AND PROTEIN SYNTHESIS CAPACITY OF *RHYNCHOCYPRIS LAGOWSKII* DYBOWSKI

水生生物学报. 2018, 42(4): 709–718 <https://doi.org/10.7541/2018.087>

黄颡鱼 *Wnt* 家族4个基因的克隆、组织表达及对铜的响应

CLONING AND TISSUE EXPRESSION OF FOUR WNT GENES IN YELLOW CATFISH *PELTEOBAGRUS FULVIDRACO* AND THEIR RESPONSE TO COPPER EXPOSURE

水生生物学报. 2018, 42(3): 463–472 <https://doi.org/10.7541/2018.058>

金鱼胰蛋白酶原基因的克隆及镉和过氧化氢暴露对其基因表达的影响

MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF TRYPSINOGEN GENE IN GOLDFISH (*CARASSIUS AURATUS*) AND ITS EXPRESSION PROFILES IN RESPONSE TO CADMIUM AND OXIDATIVE STRESS

水生生物学报. 2018, 42(1): 68–76 <https://doi.org/10.7541/2018.009>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2021.2020.046

不同C/N生物絮团对洛氏鲮急性铜暴露保护作用

于哲^{1,2} 吴莉芳² 李良^{1,2} 朱瑞^{1,2}

(1. 吉林农业大学生命科学技术学院, 长春 130118; 2. 吉林农业大学动物科学技术学院, 动物生产及产品质量安全教育部重点实验室, 长春 130118)

摘要: 实验旨在探索不同C/N生物絮团对急性铜暴露洛氏鲮免疫抑制、炎症反应与氧化应激的保护作用。挑选480尾洛氏鲮(*Rhynchocypris lagowskii* Dybowski)幼鱼(10±0.15) g, 随机分成4组, 每组3个重复, 每个重复40尾鱼。对照组饲喂商品料(C/N 10.8:1), 实验组选择葡萄糖为外添碳源调节C/N 15:1(II组)、C/N 20:1(III组)和C/N 25:1(IV组), 生长实验为56d, 之后进行为期96h的急性铜暴露胁迫实验。结果表明, 各实验组中免疫、抗氧化酶活性与炎症因子含量随着C/N的增加先升高后下降。其中, 与对照组相比, III和IV组血清碱性磷酸酶(AKP)、酸性磷酸酶(ACP)、溶菌酶(LSZ)、一氧化氮合酶(NOS)、补体C3、C4和免疫球蛋白M(IgM)水平显著升高($P<0.05$), 而III和IV组之间补体C3和C4水平差异不显著($P>0.05$); III和IV组血清过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸(ASA)、超氧化物歧化酶(SOD)、总抗氧化能力(T-AOC)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)与谷胱甘肽还原酶(GR)酶活性显著高于对照组($P<0.05$), 而丙二醛(MDA)含量显著低于对照组($P<0.05$)。同时 II 组的SOD和CAT酶活性也有所升高, 且与对照组差异显著($P<0.05$); III和IV组血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素1 β (IL-1 β)与白介素-6(IL-6)含量显著低于对照组($P<0.05$), 且它们两组之间无显著差异($P>0.05$)。然而, II、III和IV组白介素-2(IL-2)含量均显著高于对照组, 且第III组含量最高。在实验条件下, 当C/N $\geq 15:1$ 时, 生物絮团能有效地增强急性铜暴露下洛氏鲮的免疫与抗氧化酶活力, 且在C/N为20:1时效果最为显著。

关键词: 生物絮团; 铜暴露; 免疫抑制; 炎症反应; 氧化应激; 洛氏鲮

中图分类号: S965.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2021)03-0601-08



随着工业的快速发展, 各种重金属及其类似物废水直接或间接地排入江河湖海之中, 对水环境造成了不可恢复的污染^[1-3]。铜是水体中主要的重金属污染物之一, 也是维持生命正常发育和新陈代谢所必需的重要微量元素。以鱼类为主的水生生物对铜有一定的富集和积累能力, 然而过量的积累将扰乱水生动物的正常生命活动, 造成其急、慢性中毒甚至死亡^[4, 5]。生物絮团技术(BFT)是近年来发展起来的一种环境友好型养殖模式, 它的基本原理主要是循环利用剩余的营养物质, 以产生微生物生物量, 这些微生物生物量既可以用来就地喂养养殖的鱼类, 也可以作为动物饲料的一种成分进行收获和加工^[6-8]。同时, BFT不仅可以作为微生物的载

体, 还能通过调节养殖池中微生物的组成, 利用微生物之间的相互作用, 转化对系统中生物有很高毒性的氨氮和亚硝酸盐, 来实现控制水质的目的^[9, 10]。目前, 关于重金属铜对水体污染的研究较少, 主要体现在介绍铜对水生生物的危害上, 如: 组织积累、氧化应激、炎症反应及免疫抑制等^[11-13]; 关于生物絮团的研究, 主要集中在: BFT对水生生物(鱼、虾等)营养与免疫的研究^[7, 9]、对养殖水体水质的研究^[8]、对肠道菌群的研究^[14]及关于生物絮团C/N的研究^[15-17]。而关于不同C/N生物絮团对急性铜暴露洛氏鲮的免疫、抗氧化酶活性及炎症反应的影响则鲜有研究。

本实验甄选病害少, 抗逆性强, 味道鲜美, 无肌

收稿日期: 2020-03-10; 修订日期: 2020-08-16

基金项目: 吉林省科技厅重点科技攻关项目(20200402038NC)资助 [Supported by the Jilin Provincial Department of Scientific and Technological Key Science and Technology Projects (20200402038NC)]

作者简介: 于哲(1990—), 男, 在读硕士; 研究方向为水生生物学。E-mail: 1415986811@qq.com

通信作者: 吴莉芳(1970—), 女, 教授, 博士; 研究方向为动物营养与饲料学。E-mail: ATPepa@aliyun.com

间刺, 营养价值高, 深受广大养殖人员与消费者喜爱的我国土著杂食性小型名贵淡水经济鱼类——洛氏鲮(*Rhynchocypris lagowskii* Dybowski)^[2, 18, 19], 探讨不同C/N行成的生物絮团对急性铜暴露洛氏鲮免疫抑制、炎症反应与氧化应激的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验设计

洛氏鲮购于九台区泉源鱼苗养殖场, 饲养于吉林农业大学水产研究室玻璃水族箱中, 暂养2周使其适应环境, 期间投喂商品日粮(通威饲料有限公司, 粗蛋白36%、粗脂肪8.0%、粗纤维4.0%和粗灰分6.4%)使其适应基础料。根据我们课题组之前发表^[2, 18–20]培养生物絮团与调节C/N的方法, 选择无水葡萄糖粉(99.97%)为外加碳源, 按照C/N不同设置4个实验组: 对照组(C/N 10.8:1)、II组(C/N 15:1)、III组(C/N 20:1)和IV组(C/N 25:1)。

1.2 饲养管理

在实验开始前, 停食24h, 选取480尾规格一致, 体质健壮的洛氏鲮幼鱼(10 ± 0.15 g), 随机分入12个玻璃缸中(100 L水), 每缸40尾, 期间水温控制(18 ± 2)°C, 按2%—3%投饵率日投喂2次(9:00和18:00), 每日19:00向鱼缸中添加葡萄糖粉。24h不间断曝气充氧, 每周测量溶解氧、pH、氨氮、亚硝酸盐和总磷等, 确保各项水质指标均符合洛氏鲮的生长条件。在8周饲养实验结束后, 进行96 h的急性攻毒胁迫实验, 根据前期研究, 铜暴露洛氏鲮的半致死浓度为 1.03 mg/L ^[2], 向各实验组添加调配好浓度的无水硫酸铜(CuSO_4)。攻毒期间的实验条件与饲养实验条件一致, 但是并未投喂。

1.3 样品收集及测定方法

水质指标与水体中铜浓度 实验期间使用多参数水质测试仪YSI556测定水质指标; 絮团体积采用Imhoff锥形管法测定; 总体悬浮物使用TOYO定量滤纸抽滤法测定; 在铜暴露实验结束前后, 分别从每个鱼缸中取5 mL养殖水体与10 mL浓硝酸(65% HNO_3)混合, 经消化作用72h后, 4°C离心10min ($12000 \times g$), 最后, 取上清液用AA-6300原子吸收光谱仪测定铜的浓度。

生长性能 在饲养实验结束后, 停食24h, 每桶随机选取洛氏鲮10尾, 测其体长和体质量, 用于各项指标的测。特定生长率、增重率、存活率和饲料转化率的测试方法参考Long等^[8]和Yu等^[18–20]。

免疫、抗氧化与炎症反应指标 在胁迫实验结束后, 从每缸随机取洛氏鲮10尾, 经MS-222(200 mg/L)麻醉后用2.0 mL肝素钠注射器尾静

脉采血, 血样4°C离心10min(5000 r/min)收集血清, -20°C 保存待测。

AKP、ACP(对硝基苯磷酸盐法)、LSZ(比浊法)、NOS(硝酸还原酶法)、C3、C4、IgM(免疫比浊法); CAT(可见光测定法)、ASA(比色法)、SOD(黄嘌呤氧化酶法)、T-AOC(ABTS速测法)、GSH-PX(二硫代二硝基苯甲酸法)、GR(紫外分光光度法)和MDA(TBA法); TNF- α 、IL-1 β 、IL-2和IL-6采用双抗体夹心ELISA法, 具体参照Yu等^[2, 19, 20]。以上试剂盒均购买于南京建成生物工程研究所。

1.4 统计分析

结果以平均数 $\pm$ 标准差表示。采用SPSS(20.0)软件对数据进行单因素方差分析(ANOVA), 以确定显著性差异, 再用Tukey's多极差检验比较均值($P < 0.05$), 确定差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同C/N生物絮团对养殖水体水质的影响

如表1所示, 各组水温、胁迫后 CuSO_4 浓度无显著差异($P > 0.05$); II、III和IV组pH、溶解氧、氨氮和亚硝酸盐显著低于对照组($P < 0.05$), 且各组之间差异不显著($P > 0.05$); III和IV组总磷与透明度显著低于对照组($P < 0.05$), 其互相之间差异不显著($P > 0.05$)。相反的是: III和IV组絮团体积与总体悬浮物显著高于对照组($P < 0.05$), 而III和IV组之间无显著差异($P > 0.05$)。

2.2 不同C/N生物絮团对洛氏鲮生长性能的影响

如表2所示, III和IV组末体质量、特定生长率和增重率显著高于对照组, 而饲料转化率显著高于对照组($P < 0.05$), 且III和IV组之间差异不显著($P > 0.05$); II和III组的存活率显著高于对照组与IV组($P < 0.05$)。

2.3 不同C/N生物絮团对铜暴露洛氏鲮免疫酶活力的影响

由图1可知, 生物絮团对铜暴露洛氏鲮免疫抑制具有一定的缓解作用, 其中: III组各项免疫酶活力均显著高于对照组($P < 0.05$), IV组的ACP和补体C3, II组的ACP、补体C4与IgM含量也显著高于对照组($P < 0.05$)。LSZ与AKP活力在II、III和IV组之间差异不显著($P > 0.05$); NOS活力在II和IV组和对照组之间差异不显著($P > 0.05$)。

2.4 不同C/N生物絮团对铜暴露洛氏鲮炎症因子的影响

由图2可见, 不同C/N生物絮团对铜暴露洛氏鲮的炎症反应具有不同的缓解效果, 其中III组和IV组TNF- α 与IL-1 β 含量显著低于对照组, 且这两组

表 1 不同C/N生物絮团对养殖水体水质的影响

Tab. 1 Effects of different C/N ratios formed bioflocs on aquaculture water quality

指标Index	对照组	II 组	III组	IV 组
水温Water temperature (°C)	18.54 ± 2.03	18.67±1.54	19.06±1.32	18.97±2.12
pH	7.52±0.36 ^b	7.25±0.31 ^a	7.21±0.29 ^a	7.20±0.27 ^a
溶解氧Dissolved oxygen (mg/L)	6.02±0.14 ^b	5.49±0.11 ^a	5.48±0.07 ^a	5.41±0.09 ^a
氨氮Ammonia nitrogen (mg/L)	0.43±0.05 ^b	0.15±0.04 ^a	0.12±0.06 ^a	0.14±0.07 ^a
亚硝酸盐Nitrite (mg/L)	0.13±0.03 ^b	0.03±0.01 ^a	0.01±0.01 ^a	0.01±0.01 ^a
总磷Total phosphorus (mg/L)	0.65±0.17 ^b	0.61±0.18 ^b	0.55±0.17 ^a	0.58±0.2 ^a
透明度Transparency (cm)	19.54±3.08 ^c	14.77±2.56 ^b	12.96±2.82 ^a	10.47±2.19 ^a
絮团体积Bioflocs volume (ml/L)	28.88±3.11 ^a	33.18±2.96 ^a	55.69±5.61 ^b	68.73±5.19 ^b
总体悬浮物Total suspended matter (mg/L)	324.98±17.93 ^a	378±23.46 ^a	580.6±40.26 ^b	642.72±37.25 ^b
添加CuSO ₄ 浓度Add concentration (mg/L)	1.030	1.030	1.030	1.030
实测CuSO ₄ 浓度Real concentration (mg/L)	1.010±0.020	1.007±0.031	1.020±0.020	1.013±0.021
胁迫后CuSO ₄ 浓度After stress concentration (mg/L)	1.009±0.014	0.997±0.152	0.980±0.026	0.987±0.152

注: 实验数据表示为“平均值±标准差”(n=3), 同行数据肩标有不同小写字母者表示差异显著(P<0.05), 相同小写字母或无字母表示差异不显著(P>0.05); 下表同

Note: Values were expressed as “mean ± standard deviation” (n=3), and different lowercase letters were significant different (P<0.05). The same lowercase letter or no letter indicates not significant (P>0.05); the same applies below

表 2 不同C/N生物絮团对洛氏鲮生长性能的影响

Tab. 2 Effects of different C/N ratios formed bioflocs on growth performance of *R. lagowskii*

指标Index	对照组	II 组	III组	IV 组
初始体质量Initial body weight (g)	10.05±0.09	10.11±0.10	10.04±0.12	10.10±0.15
末体质量Final body weight (g)	29.71±2.07 ^a	33.12±2.85 ^{ab}	39.58±3.72 ^b	40.17±2.44 ^b
饲料转化率Feed conversion ratio	1.88±0.11 ^c	1.74±0.17 ^c	1.25±0.12 ^a	1.36±0.09 ^b
特定生长率Specific growth rate (%)	1.94±0.08 ^a	2.12±0.35 ^{ab}	2.46±0.22 ^{bc}	2.47±0.29 ^c
增重率Weight gain rate (%)	195.62±20.37 ^a	227.59±24.16 ^{ab}	294.22±30.11 ^b	297.72±32.66 ^b
存活率Survival rate (%)	90.00±2.50 ^a	97.50±2.50 ^b	99.17±1.44 ^b	90.00±2.50 ^a

之间差异不显著(P>0.05); IL-6含量在各实验组(II、III和IV组)中均显著低于对照组(P<0.05), 且II、III和IV组之间无显著差异(P>0.05); 关于IL-2的含量, II、III和IV组均显著高于对照组(P<0.05), 其中III组含量最高, II和IV组之间无显著差异(P>0.05)。

2.5 不同C/N生物絮团对铜暴露洛氏鲮抗氧化酶的影响

由图3可见, 生物絮团对铜暴露洛氏鲮氧化应激具有一定的缓解作用, 其中: III和IV组SOD、GR和GSH-PX活性均显著高于对照组(P<0.05), 然而它们之间无显著差异(P>0.05)。与对照组相比, II组的T-AOC和ASA含量差异不显著(P>0.05), 但是III和IV组显著升高, 且III组显著高于I、II和IV组(P<0.05); 各实验组(II、III和IV组)中的

CAT活性均显著高于对照组(P<0.05), 其中III组呈最大值, II组与IV组无显著差异(P>0.05); MDA含量随着碳氮比的升高, 呈下降趋势, 当C/N 15(III组)时达到最低值, 之后略有回升。与对照组相比, II、III和IV组均显著下降(P<0.05), 但是II和IV组差异不显著, III和IV组也无显著差异(P>0.05)。

3 讨论

3.1 不同C/N生物絮团对洛氏鲮生长及养殖水体水质的影响

大量研究表明, 生物絮团可促进养殖动物的生长, 净化养殖水体, 当C/N适当时, 鱼类表现出最佳的生长趋势^[6, 8, 16, 17]。本实验结果显示, 随着C/N的升高, 洛氏鲮的增重率和特定生长率呈上升趋势, 说明在本实验条件下, 高碳氮比形成的生物絮团有效地促进了洛氏鲮的生长; III组饲料转化率显著低于对照组, 表明C/N20:1时形成的絮凝物可作为洛氏鲮的天然饵料, 并且可以连续在原位获得额外的蛋白质、脂肪、矿物质和维生素, 以加快生长进度, 与Wang等^[17]所得结果基本吻合。IV组虽然在末体重、增重率与特定生长率上都出现最高值, 但在存活率上却与对照组不相上下, 究其原因可能是C/N过高, 导致异养菌大量增殖, 总体悬浮物含量过饱和, 堵塞鱼鳃, 不利于鱼类呼吸。

Avnimelech^[21]研究表明, 当水体C/N为15.75以上时, BFT能显著净化水质污染问题。从本文结果来看: 随着C/N的升高, 溶解氧、pH、氨氮、亚硝酸盐、总磷、透明度及胁迫后CuSO₄浓度均呈下

降趋势。溶解氧下降是由于微生物繁殖生长消耗大量氧气^[16]; pH下降可能是洛氏鲮和微生物生长,呼吸放出的CO₂增多,导致废物累积和酸败^[22]; Hari等^[23]指出额外添加碳源可有效降低水体里的氨氮、亚硝酸盐与总磷的浓度,原因可能是生物絮团对含氮污染物的快速异养转化^[16],与本文结果相似;透明度持续下降是因为饲料的不断投入与异养菌大量繁殖^[19];攻毒后CuSO₄浓度下降,可能是絮团对水体中铜的吸附、沉降等作用引起的^[2]。

3.2 不同C/N生物絮团对铜暴露洛氏鲮免疫抑制的缓解作用

免疫指标是监测环境危害对鱼类健康潜在影

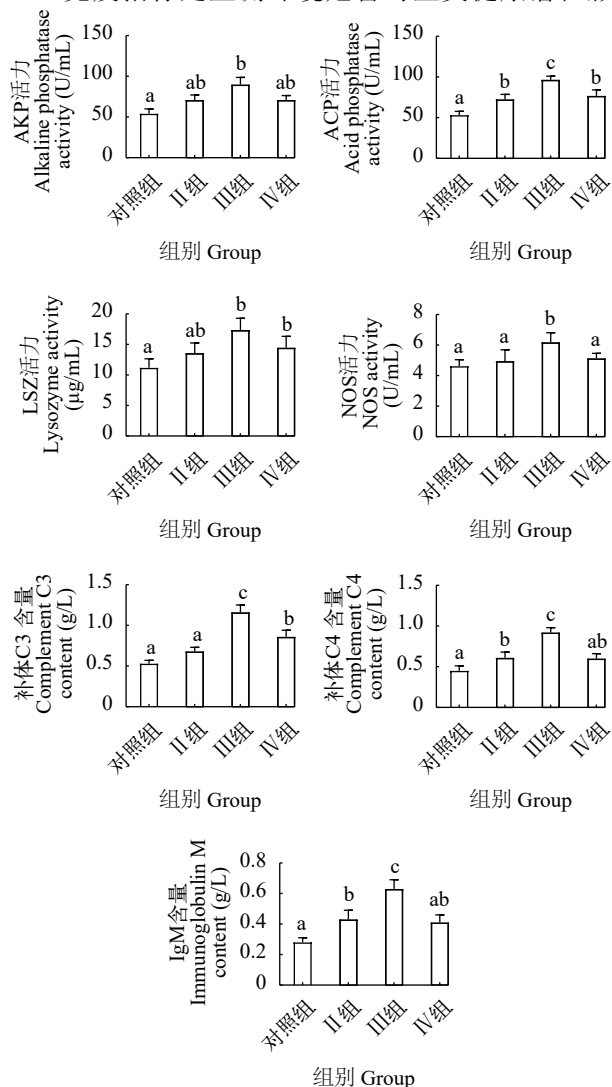


图1 不同C/N生物絮团对铜暴露洛氏鲮血清免疫酶的影响

Fig. 1 Effects of different C/N ratios formed bioflocs on serum immune enzymes of *R. lagowskii* in waterborne copper exposure
字母不同表示同一时间各实验组之间存在显著性差异($P < 0.05$);下同

Values with the same letters are not significantly different at the same time ($P < 0.05$); the same applies below

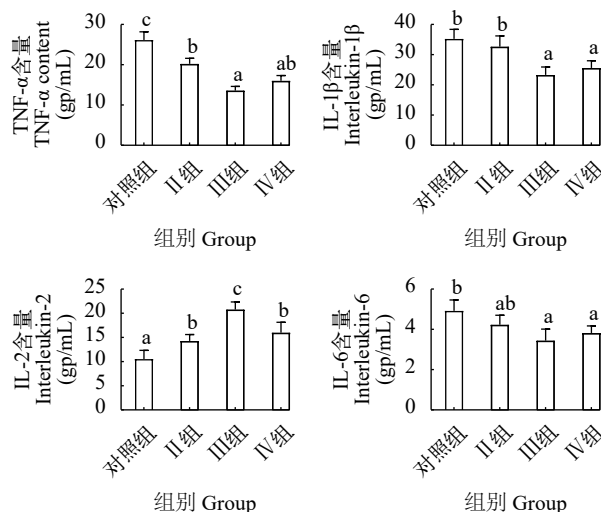


图2 不同C/N生物絮团对铜暴露洛氏鲮血清炎症因子的影响
Fig. 2 Effects of different C/N ratios formed bioflocs on serum inflammation factors of *R. lagowskii* in waterborne copper exposure

响的重要参数,作为抵御病原微生物的第一道防线,非特异性免疫与先天免疫系统在保护鱼类健康方面起着至关重要的作用^[2, 24-26]。LSZ作为非特异性免疫系统的重要组成部分,能水解病原菌中的黏多糖,分解细菌细胞壁上肽聚糖中N-乙酰胞壁酸和N-乙酰氨基葡萄糖之间的β-(1,4)糖苷键,在清除侵袭性病原体 and 细菌方面发挥着至关重要的作用^[27],AKP和ACP是参与动物免疫的一种重要水解酶,在免疫应答过程中能增强血细胞识别异物,改变病原体表面结构^[19, 20]。NOS能帮助巨噬细胞对抗免疫系统中的病原体^[2]。在本实验中,第III组中的LSZ、AKP、ACP和NOS活力显著高于对照组,表明当养殖水体中C/N为20:1时,能显著缓解铜暴露洛氏鲮的免疫抑制,增强其对环境胁迫的抗性。而当C/N为15:1与25:1时,LSZ、AKP和NOS活力与对照组无显著差异,这可能是由于低C/N絮团或过高C/N絮团对铜暴露洛氏鲮的免疫酶影响不大。Liu等^[28]研究生物絮团增强罗非鱼拥挤胁迫耐受能力,结果显示C/N20:1组显著提高了LSZ和AKP活力,与本实验结果大致吻合。补体C3和C4是参与体液免疫的大分子,可以通过溶解免疫球蛋白复合物杀死病毒和细菌,促进炎症反应^[29]。IgM是衡量鱼类体液免疫功能的重要指标^[30]。在本实验中,在不同C/N生物絮团对洛氏鲮补体C3、C4和IgM的影响略有不同,但总体趋势皆为先升高后趋于平缓。与对照组相比,第III组中的补体C3、C4和IgM水平显著升高。以上结果可能是由于,鱼类摄食或生存于不同C/N形成的生物絮团环境中,而一定范围之

内,高C/N生物絮团内含有多种微生物、益生菌和生物活性物质,可以提高鱼类免疫酶活性,并通过次生代谢产物使宿主受益^[31,32]。同时,它们的细胞成分或代谢物(类胡萝卜素等)可以作为免疫刺激剂,改善先天免疫系统并提供对宿主的保护^[2,9]。此外,高C/N生物絮团还能通过促进鱼类生长,诱导其消化道微生物区系的变化,获得提高免疫力和抵御环境应激的能力^[20]。

3.3 不同C/N生物絮团对铜暴露洛氏鲮炎症反应的缓解作用

鱼类的免疫功能与炎症密切相关,炎症是由细胞因子介导和启动的,已有实验表明重金属铜可诱导头肾免疫相关基因转录和细胞应激反应的变化^[33]。细胞因子是一组多肽类细胞调节物质,包括白细胞介素、肿瘤坏死因子和细胞刺激因子等,主要由外

周免疫细胞合成。众所周知,IL-1 β 和TNF- α 是2种强大的促炎因子,可通过调节其他细胞因子的表达来诱导炎症反应^[34]。IL-2可促进T淋巴细胞增殖和分化,诱导和增强致死性T细胞、单核细胞和巨噬细胞的活性;IL-6和IL-1共同促进T细胞增殖并参与炎症和发热^[35]。在本研究中,当C/N $\geq$ 20:1时,BFT显著降低了铜暴露洛氏鲮血清的IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平,升高了IL-2水平。这表明高C/N生物絮团能有效缓解洛氏鲮铜暴露所引起的炎症反应,与Yu等^[18]利用BFT缓解氨胁迫引起的洛氏鲮炎症反应结果相似。究其结果可能是由于高碳氮比BFT系统中能形成大量有益菌群,有益菌群通过产生有机酸、细菌素或争夺营养物质抑制有害菌的繁殖,还可抑制有害菌产生内毒素和致癌物质,降低炎症因子水平,从而实现免疫调节作用^[2,9]。同时,BFT中的益生菌(芽孢杆菌、乳酸菌和丁酸梭菌等)能进入鱼类肠道,通过代谢物或表面抗原刺激鱼类免疫体系,与有害菌竞争营养和附着位点,保护鱼类免受病原菌侵染,进而增强鱼类非特异性免疫力^[36,37]。此外,BFT系统中水生微生物的微生态平衡可以有效控制氨氮和亚硝酸盐,降低条件性病原微生物致病的几率^[38]。

3.4 不同C/N生物絮团对铜暴露洛氏鲮抗氧化应激的缓解作用

生物体具有复杂而又精密的抗氧化防御系统,在一定范围内,可以及时有效地清除重金属积累产生的活性氧(ROS),减少脂质变化引起的细胞损伤,保护细胞免受氧化应激的伤害^[1-3,26]。众所周知,内源性抗氧化酶,包括SOD、CAT、T-AOC、GSH-PX、GR和ASA是抵御氧化应激的第一道防线^[2,19,20,39]。Xu等^[40]研究表明,絮团组在血浆与肝胰脏中出现相对较高的SOD与T-AOC活性,而GSH-PX活性与对照组差异不显著。Chen等^[15]研究结果显示:高C/N下生物絮团能显著提高仿刺参体液SOD、CAT和GSH-PX活力。Yu等^[20]研究表明,当C/N=20:1时,生物絮团能有效提高黄金鲫肝胰脏、肠道与肾脏中SOD、CAT、GSH-PX与T-AOC活性,降低MDA水平。且在我们实验组的前期发现中,C/N 20:1形成的生物絮团对洛氏鲮各个组织(鳃、脑、肾、脾、肝和肠)的抗氧化酶活性均有不同程度的提高^[19]。在本实验中,与对照组相比,除MDA外,铜暴露洛氏鲮血清抗氧化酶(III和IV组)均显著提高,相反的是,MDA含量显著降低。这表明在C/N $\geq$ 20:1情况下,BFT可以有效提高抗氧化酶活性,降低脂质变化引起的超氧化物损伤,缓解洛氏鲮经铜暴露而引起的一系列氧化应激反应。这

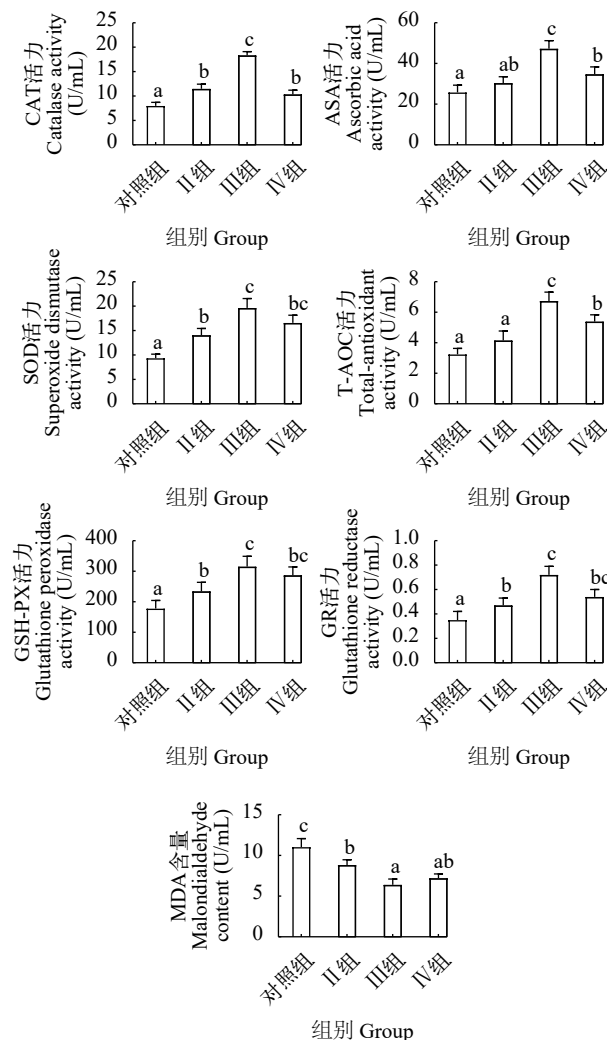


图3 不同C/N生物絮团对铜暴露洛氏鲮血清抗氧化酶的影响
Fig. 3 Effects of different C/N ratios formed bioflocs on serum antioxidant enzymes of *R. lagowskii* in waterborne copper exposure

个发现可能是由于高C/N形成的生物絮团降低了洛氏鳃的脂质过氧化水平,诱导洛氏鳃具有更强的抗氧化自由基能力,提高了其对抗环境胁迫的能力及成活率^[2, 16, 25]。此外,BFT中含有大量的天然微生物和生物活性生长因子,包括胡萝卜素、叶绿素、植物甾醇、多酚、多糖、牛磺酸和维生素,也能增强鱼类的应激反应和抗氧化功能^[19, 20, 22]。

4 结论

综上,在不同C/N水平下形成的生物絮团对铜暴露洛氏鳃的免疫抑制、炎症反应与氧化应激有不同的影响。当C/N=20:1时,生物絮团能显著提高铜暴露洛氏鳃免疫酶(AKP、ACP、LSZ、NOS、C3、C4和IgM)活力和抗氧化酶(CAT、ASA、T-AOC、SOD、GSH-PX和GR)活力,降低MDA含量,稳定炎症因子(IL-1 β 、TNF- α 、IL-2和IL-6),从而有利于洛氏鳃缓解铜暴露引起的应激反应。

参考文献:

- [1] Wang N, Jiang M, Zhang P J, *et al.* Amelioration of Cd-induced bioaccumulation, oxidative stress and intestinal microbiota by *Bacillus cereus* in *Carassius auratus gibelio* [J]. *Chemosphere*, 2020(245): 125613.
- [2] Yu Z, Zheng Y G, Du H L, *et al.* Bioflocs protects copper-induced inflammatory response and oxidative stress in *Rhynchocypris lagowski* Dybowski through inhibiting NF- κ B and Nrf2 signaling pathways [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020(98): 466-476.
- [3] Yin Y W, Zhang, P J, Yue X Y, *et al.* Effect of subchronic exposure to lead (Pb) and *Bacillus subtilis* on *Carassius auratus gibelio*: Bioaccumulation, antioxidant responses and immune responses [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018(161): 755-762.
- [4] Boeck G D, Vlaeminck A, Blust R. Effects of sublethal copper exposure on copper accumulation, food consumption, growth, energy stores, and nucleic acid content in common carp [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1997(33): 415-422.
- [5] Shaw B J, Bairuty G A, Handy R D, *et al.* Effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Physiology and accumulation [J]. *Aquatic Toxicology*, 2012(116): 90-101.
- [6] Avnimelech Y. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds [J]. *Aquaculture*, 2007, **264**(1-4): 140-147.
- [7] Panigrahi A, Sundaram M, Saranya C, *et al.* Influence of differential protein levels of feed on production performance and immune response of pacific white leg shrimp in a biofloc-based system [J]. *Aquaculture*, 2019(503): 118-127.
- [8] Long L, Yang J, Li Y, *et al.* Effect of biofloc technology on growth, digestive enzyme activity, hematology, and immune response of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Aquaculture*, 2015(448): 135-141.
- [9] Bakhshi F, Najdegerami E H, Manaffar R, *et al.* Use of different carbon sources for the biofloc system during the grow-out culture of common carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings [J]. *Aquaculture*, 2018(484): 259-267.
- [10] Deng M, Chen J Y, Gou J W, *et al.* The effect of different carbon sources on water quality, microbial community and structure of biofloc systems [J]. *Aquaculture*, 2018(482): 103-110.
- [11] Eyckmans M, Celis N, Horemans N R, *et al.* Exposure to waterborne copper reveals differences in oxidative stress response in three freshwater fish species [J]. *Aquatic Toxicology*, 2011(103): 112-120.
- [12] Mitra A S, Keswani T, Ghosh N, *et al.* Copper induced immunotoxicity promote differential apoptotic pathways in spleen and thymus [J]. *Toxicology*, 2013(306): 74-84.
- [13] Machado A A, Hoff M L M, Klein R D, *et al.* Biomarkers of waterborne copper exposure in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to salt water [J]. *Aquatic Toxicology*, 2013(138-139): 60-69.
- [14] Panigrahi A, Saranya C, Sundaram M, *et al.* Carbon: Nitrogen (C: N) ratio level variation influences microbial community of the system and growth as well as immunity of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in biofloc based culture system [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018(81): 329-337.
- [15] Chen J, Ren Y, Li Y, *et al.* Regulation of growth, intestinal microbiota, non-specific immune response and disease resistance of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*, (Selenka) in biofloc systems [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018(77): 175-186.
- [16] Ren W J, Li L, Dong S. L, *et al.* Effects of C/N ratio and light on ammonia nitrogen uptake in *Litopenaeus vannamei* culture tanks [J]. *Aquaculture*, 2019(498): 123-131.
- [17] Wang G J, Yu E M, Xie J, *et al.* Effect of C/N ratio on water quality in zero-water exchange tanks and the biofloc supplementation in feed on the growth performance of crucian carp, *Carassius auratus* [J]. *Aquaculture*, 2015(443): 98-104.
- [18] Yu Z, Wu X Q, Zheng L Q, *et al.* Effect of acute exposure to ammonia and BFT alterations on *Rhynchocypris lagowski*: Digestive enzyme, inflammation response, oxidative stress and immunological parameters [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2020(78): 103380.
- [19] Yu Z, Li L, Zhu R, *et al.* Effects of bioflocs with different C/N ratios on growth, immunological parameters, antioxidants and culture water quality in *Opsariichthys kaopingensis* Dybowski [J]. *Aquaculture Research*, 2020(51): 805-815.

- [20] Yu Z, Li L, Zhu R, *et al.* Monitoring of growth, digestive enzyme activity, immune response and water quality parameters of golden crucian carp (*Carassius auratus*) in zero water exchange tanks of biofloc systems [J]. *Aquaculture Reports*, 2020(16): 100283.
- [21] Avnimelech Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems [J]. *Aquaculture*, 1999, **176**(3-4): 227-235.
- [22] Yu Z, Wu L F, Dai Z Y, *et al.* Effects of biofloc with different C/N levels on growth performance, digestive enzyme activity and culture water quality of golden crucian carp (*Carassius auratus*) [J]. *Feed Industry*, 2019, **40**(22): 40-47. [于哲, 吴莉芳, 代忠义, 等. 不同C/N水平生物絮团对黄金鲫生长性能、消化酶活力及养殖水体水质的影响 [J]. 饲料工业, 2019, **40**(22): 40-47.]
- [23] Hari B, Madhusoodana K B, Varghese J T, *et al.* The effect of carbohydrate addition on water quality and the nitrogen budget in extensive shrimp culture systems [J]. *Aquaculture*, 2006, **252**(2-4): 248-263.
- [24] Li M Y, Zhu X M, Tian J X, *et al.* Dietary flavonoids from *Allium mongolicum* Regel promotes growth, improves immune, antioxidant status, immune-related signaling molecules and disease resistance in juvenile northern snakehead fish (*Channa argus*) [J]. *Aquaculture*, 2019(501): 473-481.
- [25] Mansour A T, Esteban M A. Effects of carbon sources and plant protein levels in a biofloc system on growth performance, and the immune and antioxidant status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017(64): 202-209.
- [26] Li M Y, Guo W G, Guo W L, *et al.* Effect of sub-chronic exposure to selenium and *Allium mongolicum* Regel flavonoids on *Channa argus*: Bioaccumulation, oxidative stress, immune responses and immune-related signaling molecules [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019(91): 122-129.
- [27] Callewaert L, Michiels C. Lysozymes in the animal kingdom [J]. *Journal of Biosciences*, 2010(35): 127-160.
- [28] Liu G, Ye Z Y, Liu D Z, *et al.* Influence of stocking density on growth, digestive enzyme activities, immune responses, antioxidant of, *Oreochromis niloticus*, fingerlings in biofloc systems [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018(81): 416-422.
- [29] Ekdahl K N, Mohlin C M, Adler A, *et al.* Is generation of C3 (H₂O) necessary for activation of the alternative pathway in real life [J]? *Molecular Immunology*, 2019(114): 353-361.
- [30] Ludwig K, Grabhorn E, Bitzan M, *et al.* Saliva IgM and IgA are a Sensitive indicator of the humoral immune response to *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide in children with enteropathic hemolytic uremic syndrome [J]. *Pediatric Research*, 2002(52): 32-48.
- [31] Defoiedt T, Boon N, Soegeloos P, *et al.* Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example [J]. *Trends in Biotechnology*, 2007(25): 472-479.
- [32] Yu Z, Li L, Zhu R, *et al.* Effects of biofloc on growth, digestion and aquaculture water quality of aquatic animals [J]. *Fishery Modernization*, 2019, **46**(2): 15-21. [于哲, 李良, 朱瑞, 等. 生物絮团对水产动物生长、消化及养殖水体水质的影响 [J]. 渔业现代化, 2019, **46**(2): 15-21.]
- [33] Prieto-Alamo M J, Abril N, Osuna-Jiménez I, *et al.* Solea senegalensis genes responding to lipopolysaccharide and copper sulphate challenges: large-scale identification by suppression subtractive hybridization and absolute quantification of transcriptional profiles by real-time RT-PCR [J]. *Aquatic Toxicology*, 2009(91): 312-319.
- [34] Zhang C N, Zhang J L, Ren H T, *et al.* Effect of tributyltin on antioxidant ability and immune responses of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2017(138): 1-8.
- [35] Jia Y W, Pang C, Zhao K X, *et al.* Garcinol suppresses IL-1 β -induced chondrocyte inflammation and osteoarthritis via inhibition of the NF- κ B signaling pathway [J]. *Inflammation*, 2019(42): 1754-1766.
- [36] Yu Z, Quan Y N, Huang Z Q, *et al.* Monitoring oxidative stress, immune response, Nrf2/NF- κ B signaling molecules of *Rhynchocypris lagowski* living in BFT system and exposed to waterborne ammonia [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020(205): 111161.
- [37] Hu X J, Cao Y C, Wen G L, *et al.* Effect of combined use of Bacillus and molasses on microbial communities in shrimp cultural enclosure systems [J]. *Aquaculture Research*, 2017(48): 2691-2705.
- [38] Hao K L, Han D L, Hui W, *et al.* Biofloc formation improves water quality and fish yield in a freshwater pond aquaculture system [J]. *Aquaculture*, 2019(506): 256-269.
- [39] Feng L, Chen Y P, Jiang W D, *et al.* Modulation of immune response, physical barrier and related signaling factors in the gills of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fed supplemented diet with phospholipids [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016(48): 79-93.
- [40] Xu W J, Pan L Q. Enhancement of immune response and antioxidant status of *Litopenaeus vannamei* juvenile in biofloc-based culture tanks manipulating high C/N ratio of feed input [J]. *Aquaculture*, 2013(412-413): 117-124.

PROTECTIVE EFFECTS OF DIFFERENT C/N RATIOS FORMED BIOFLOCS ON ACUTE COPPER EXPOSURE OF *RHYNCHOCYPRIS LAGOWSKII* DYBOWSKI

YU Zhe^{1,2}, WU Li-Fang², LI Liang^{1,2} and ZHU Rui^{1,2}

(1. College of Life Sciences, Jilin Agricultural University Changchun, Jilin 130118, China; 2. Key Laboratory of Animal Production, Product Quality and Security, Ministry of Education, College of Animal Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: This study combined BFT with waterborne copper to explore the protective effects of different C/N ratios formed bioflocs of *R. lagowskii* on immunosuppression, inflammation and oxidative stress in acute copper exposure. The results showed that with the increase of C/N ratio, the activities of antioxidation, immune enzymes and anti-inflammation factor of each group increased at first and then decreased. Compared with the control group, the levels of serum alkaline phosphatase (AKP), acid phosphatase (ACP), lysozyme (LSZ), nitric oxide synthase (NOS), complement C3, C4 and immunoglobulin M (IgM) increased significantly in III and IV groups ($P<0.05$). However, there was no significant difference in complement C3 and C4 content between III and IV groups ($P>0.05$). The activities of serum catalase (CAT), ascorbic acid (ASA), superoxide dismutase (SOD), total antioxidant capacity (T-AOC), glutathione peroxidase (GSH-PX) and glutathione reductase (GR) enzyme in III and IV groups were significantly higher than those in the control ($P<0.05$), while the content of malondialdehyde (MDA) was significantly lower than that in the control group ($P<0.05$). At the same time, the activities of SOD and CAT in treatment II were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). The serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6) in III and IV groups were significantly lower than those in the control group ($P<0.05$) without significant difference between III group and IV group ($P>0.05$). However, the content of interleukin-2 (IL-2) in II, III and IV groups were significantly higher than that of the control group ($P<0.05$) with the highest content in group III. Overall, these findings suggest that bioflocs can effectively enhance the activities of immune and antioxidant enzymes under acute copper exposure when $C/N \geq 15$ with the most significant effect at a 20:1 C/N ratio. Therefore, this study provides a new idea for in-depth exploration of bioflocs, a new mitigation scheme for water environmental pollution and biological toxicity caused by heavy metals, and a theoretical basis for promoting the healthy and stable development of aquaculture.

Key words: Bioflocs; Copper exposure; Immunosuppression; Inflammation; Oxidative stress; *Rhynchocypris lagowskii* Dybowski