

运用脂肪酸标志法分析刺参食物来源的季节变化

高菲^{1,2}, 许强¹, 杨红生^{1*}

(1. 中国科学院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室, 山东 青岛 266071;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要:运用脂肪酸标志法分析了刺参的食物组成及季节变化。刺参饵料中含有硅藻、褐藻、多种异养细菌、大型绿藻、鞭毛藻或原生动物等,其中硅藻、褐藻和细菌在全年的食物贡献比较大,各种饵料来源比例具有显著的季节变化。实验期间,刺参体壁的硅藻脂肪酸标志 22:5 ($n-3$) 相对含量很高(7.24%~14.45%),且 16:1($n-7$)/16:0 比值全年在 0.73~1.82 之间(平均 1.10),表现出典型的硅藻脂肪酸特征,表明硅藻是刺参主要的食物来源。褐藻脂肪酸标志 20:4($n-6$) 在刺参体壁脂肪酸组成中相对含量较高(4.88%~8.16%),且在秋冬季节达到较高水平,表明秋冬季节褐藻类对刺参的食物贡献可能较大。噬纤维菌—黄杆菌类的脂肪酸标志奇数碳及支链脂肪酸(Odd & br FAs, 5.31%~8.29%)和变形细菌的脂肪酸标志 [18:1($n-7$), 5.85%~6.86%] 相对含量比较高,表明细菌在全年都是刺参重要的食物来源。主成分分析发现,1 月份刺参的主要食物来源是硅藻、鞭毛藻或原生动物、褐藻及细菌;3 月份硅藻、鞭毛藻或原生动物、大型绿藻的食物贡献较大;6 月份大型绿藻在刺参的食物来源中占较大比重;7 月份细菌和大型绿藻的食物贡献较大,细菌在 8、9 月份的食物来源中占较大比重,褐藻和细菌在 10、11 月份的食物贡献较大。

关键词:刺参;食物来源;脂肪酸标志法;季节变化

中图分类号:Q 547;S 917

文献标识码:A

刺参(*Apostichopus japonicus*)为沉积食性,饵料成分复杂,目前有关刺参食物来源的研究通常采用消化道内含物分析法^[1]。但消化道内含物分析法有一些不足之处:(1)只能分析动物被采集前刚摄取的食物,具有很大的随机性;(2)难以辨别动物对该食物消化的难易程度,易于把难以消化吸收的食物误认为是动物的主要食物来源^[2];(3)海参还可以通过表皮从海水中吸收部分溶解的有机质^[3-4],通过这种途径获取的食物在消化道内不可能观察到。而脂肪酸标志法更真实地反应动物的食物来源,是分析动物食物来源的另一重要方法。选择脂肪酸作为营养学标志物是由脂肪酸的代谢特点决定的,动物在吸收食物营养过程中,饵料中的脂肪在体内被分解成脂肪酸后,被相对保守地同化至消费者的组织中,同时,一些生物类群含有某种特异脂肪酸或者相对较

高含量的某几种脂肪酸^[5],因此这些特异性的脂肪酸可以用作生物标记物^[6-8]反映动物最近一段时期内的食物来源情况。与消化道内含物分析法相比,脂肪酸标志法的优势在于可以检测动物近期摄食并实际同化的食物来源状况^[2,9]。

目前,已经确定并得到广泛认可的脂肪酸标志主要有浮游生物、大型海洋植物、异养细菌和陆源有机质等几类,其中尤其以硅藻、鞭毛藻类、细菌和陆源有机质类标志应用较广泛^[5,10-12]。国际上已广泛采用脂肪酸标志法研究海洋生物的食物关系。Cook 等^[13]用脂肪酸标志法分析发现不同生境中海胆的食物来源组成具有显著差异,生活在褐藻(*Laminaria saccharina*)繁盛的潮间带的海胆体内有高含量的 18:4 ($n-3$) 和 20:4 ($n-6$),指示了褐藻对海胆的重要食物贡献;在扇贝养殖筏架上和泥质潮间带生长的海胆

收稿日期:2009-12-28

修回日期:2010-03-11

资助项目:国家自然科学基金项目(40906071);国家科技支撑计划项目(2006BAD09A02)

通讯作者:杨红生, E-mail: hshyang@126.com

具有很低的 $18:1(n-9)/18:1(n-7)$ 比值和高含量的奇数碳及支链脂肪酸,表明生活在该生境中的海胆对底质细菌的摄食量较大。Howell等^[14]利用脂肪酸标志法调查研究了9种深海海星的可能食物源,并根据脂肪酸组成含量特征将其分成悬浮食性、捕食性/腐食性和沉积食性。Ju等^[15]运用脂肪酸标志法研究了两种南极磷虾冬季的摄食策略,发现磷虾(*Euphausia crystallorophias*)主要依赖贮存脂类越冬,而(*Euphausia superba*)则通过不断摄食来获取越冬的能量,其体内的脂肪酸标志显示桡足类是它重要的食物来源。国内采用脂肪酸标志法研究海洋生物食物来源的研究还很少,仅见于许强等^[16]运用脂肪酸标志法分析桑沟湾养殖栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)的食物来源组成。本文运用脂肪酸标志法分析了刺参食物来源组成的季节变化,研究结果可为刺参养殖专用配合饲料的研制及多元综合养殖模式的建立提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 样品采集

刺参($n=9\sim 12$)取自青岛胶南围堰池塘($35^{\circ}44'N$, $120^{\circ}01'E$)。该池塘是典型的围堰池塘,处于有海藻生长的岩礁地带,潮流畅通、水质清新、无污染、无河水流入,池塘内刺参完全摄食天然饵料。本实验在2006年7月到2007年6月采集样品,共取样8次,分别为2006年的7月20日、8月6日、9月5日、10月10日和11月27日,以及2007年的1月24日、3月29日和6月11日。

刺参从池中取出后,解剖去除内脏,冲洗干净后测体壁重。将体壁样品冷藏带回实验室,于 $-20^{\circ}C$ 冷冻保存。

1.2 样品处理

将2~3头冷冻刺参体壁样品合并,去除石灰环,切片后用冷冻真空干燥机冷冻干燥48h至恒重,用组织粉碎机粉碎,混匀,置于聚乙烯袋中,封口,于 $-20^{\circ}C$ 密封保存备用。

1.3 脂肪酸测定

取冷冻干燥样品40mg,加入1mol/L KOH/甲醇2mL,加盖振荡,在 $70\sim 75^{\circ}C$ 水浴10min(皂化),冷却后,加1mol/L HCl/甲醇3mL,加盖振荡,在 $70\sim 75^{\circ}C$ 水浴10min(甲酯化),冷却

后,加0.5mL石油醚萃取,取石油醚层1 μ L进样。

岛津GC-17A气相色谱仪,FID检测器,HP-88色谱柱(100m \times 0.25mm i.d. \times 0.2 μ m);进样口温度 $250^{\circ}C$;检测器温度 $250^{\circ}C$;初始柱温 $70^{\circ}C$,保持1min,以 $25^{\circ}C/min$ 速度升至 $280^{\circ}C$,保持10min。

1.4 脂肪酸标志

根据刺参体壁脂肪酸组成和含量的特点^[17],本文选用以下脂肪酸标志:硅藻脂肪酸标志 $16:1(n-7)/16:0$ 和EPA [$20:5(n-3)$]^[10,18]、鞭毛藻或原生动物脂肪酸标志DHA [$22:6(n-3)$]^[11,19]、大型绿藻脂肪酸标志 Σ [$18:2(n-6)+18:3(n-3)$]^[20-21]、褐藻脂肪酸标志 $20:4(n-6)$ ^[13,22]、异养细菌脂肪酸标志奇数碳及支链脂肪酸(Odd & branched FAs)和 $18:1(n-7)$ ^[12,23]。

1.5 数据分析

采用SPSS 13.0软件进行统计分析。各指标在时间尺度上的变化采用单因素方差分析(ANOVA, Tukey检验)检验,置信水平取95%。采用主成分分析^[24-25]对刺参不同季节的食物组成进行综合评价。

2 结果

2.1 硅藻脂肪酸标志季节变化

刺参体壁中两种硅藻类脂肪酸标志季节变化见图1。 $16:1(n-7)/16:0$ 比值较高(0.73~1.82,平均1.10),且具有明显的季节变化($F=8.871$, $P<0.001$),最高值出现在1月份,显著高于6-11月份($P<0.05$)。EPA季节变化显著($F=22.882$, $P<0.001$),变化规律与 $16:1(n-7)/16:0$ 一致($P<0.001$),最高值出现在1月份,显著高于6-10月份($P<0.05$)。

2.2 鞭毛藻或原生动物脂肪酸标志季节变化

刺参体壁中鞭毛藻或原生动物脂肪酸标志DHA水平较低,最高仅为4.45%,同时其相对含量存在显著的季节变化(图2, $F=5.697$, $P=0.001$),表现为夏季较低,冬春秋较高,其中1月份相对含量显著高于7-9月份($P<0.05$)。DHA/EPA比值在实验期间没有显著变化($P=0.478$),全年在0.29~0.40之间,表明与硅藻相比,鞭毛藻或原生动物的贡献比较小。

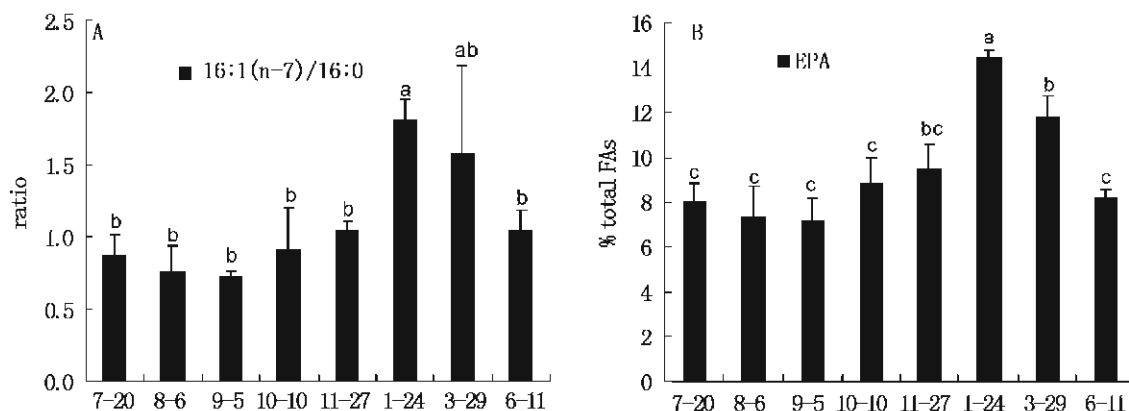


图1 刺参硅藻脂肪酸标志

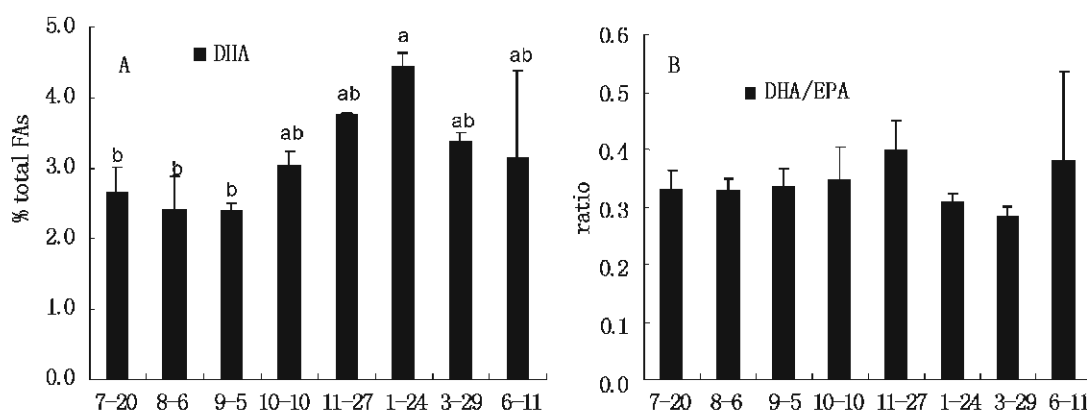
Fig. 1 Seasonal variation of diatom fatty acid biomarkers in *A. japonicus*

图2 刺参鞭毛藻或原生动物脂肪酸标志

Fig. 2 Seasonal variation of flagellate or protozoan fatty acid biomarkers in *A. japonicus*

2.3 褐藻脂肪酸标志季节变化

褐藻的脂肪酸标志 20:4(n-6) 在刺参体壁脂肪酸组成中相对含量较高, 实验期间在 4.88% ~ 8.16% 之间, 且具有明显的季节变化

($F = 13.446$, $P < 0.001$) (图 3-A), 其含量在秋冬季节达到较高水平, 表明秋冬季节刺参的褐藻类食物来源贡献较大。

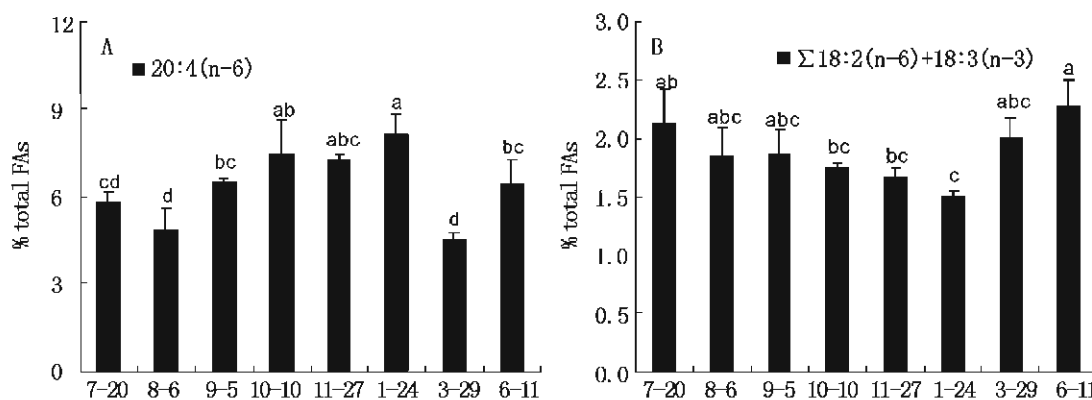


图3 刺参褐藻(A)、大型绿藻(B)脂肪酸标志季节变化

Fig. 3 Seasonal variation of brown alga (A) and Chlorophyta (B) fatty acid biomarker in *A. japonicus*

2.4 大型绿藻脂肪酸标志季节变化

大型绿藻的脂肪酸标志物 $\Sigma [18:2(n-6) + 18:3(n-3)]$ 同样存在显著的季节变化 ($F=5.596, P=0.001$) (图 3-B), 表现为夏季的 6、7 月份含量最高, 而 1 月份降到最低值, 表明 6、7 月份刺参有机质来源中大型绿藻可能占到较高比例。

2.5 细菌脂肪酸标志季节变化

Odd & br FAs 和 $18:1(n-7)$ 是细菌的脂肪酸标志物, 其变化规律见图 4。Odd & br FAs 主要指示噬纤维菌—黄杆菌类 (Cytophaga-Flavobacteria)^[20], 其相对含量在实验期间变化显著 ($F=12.080, P<0.001$), 在夏秋季节 (7 月、8 月、9 月、10 月) 较高, 显著高于冬春季 (1 月、3 月) ($P<0.05$)。 $18:1(n-7)$ 主要指示变形细菌 (Proteobacteria)^[23], 其相对含量在实验期间变化显著 ($F=5.688, P=0.001$), 且变化规律与 Odd & br FAs 相反, 最低值出现在 9 月份, 最高值出现在 1 月并且显著高于 9 月 ($P<0.05$)。

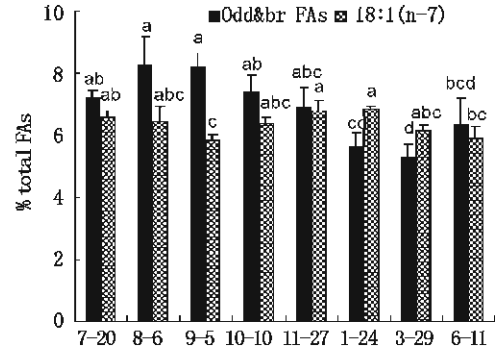


图 4 刺参细菌脂肪酸标志季节变化
Fig. 4 Seasonal variation of bacteria fatty acid biomarkers in *A. japonicus*

2.6 主成分分析

以刺参体壁中 7 种脂肪酸标志 [$16:1(n-7)/16:0$, EPA, DHA, $20:4(n-6)$, $\Sigma [18:2(n-6) + 18:3(n-3)]$, $18:1(n-7)$, Odd & br FAs] 的含量或比值为变量, 对不同时期采集的刺参样品进行主成分分析, 综合分析刺参食物组成的季节变化。各脂肪酸标志在第一 (principal component, PC1)、二主成分 (PC2) 上的分量见表 1。

表 1 刺参脂肪酸标志物的特征值

Tab. 1 The characteristic values of fatty acid biomarkers in *A. japonicus*

主成分 principal component	$16:1(n-7)/$ $16:0$	EPA	DHA	$\Sigma [18:2(n-6) +$ $18:3(n-3)]$	$20:4(n-6)$	Odd & br FAs	$18:1(n-7)$
1	0.970	0.906	0.807	-0.128	0.094	-0.983	0.233
2	0.188	0.378	0.544	-0.900	0.803	0.069	0.760

第一、二主成分对刺参食物来源季节变化的累计贡献率达到了 85.3%, 表明这两个主成分基本能反映刺参食物来源在不同季节的差异。第一主成分贡献率为 61.9%, 特征值较高的是硅藻脂肪酸标志物 [$16:1(n-7)/16:0$, EPA]、鞭毛藻或原生动物脂肪酸标志物 (DHA) 和细菌脂肪酸标志物 (Odd & br FAs), 且细菌类脂肪酸标志物与另外两种标志物呈负相关。第二主成分的贡献率为 23.4%, 特征值较大的为大型绿藻脂肪酸标志物 ($\Sigma [18:2(n-6) + 18:3(n-3)]$) 和褐藻脂肪酸标志物 [$20:4(n-6)$]、细菌脂肪酸标志物 [$18:1(n-7)$], 且大型绿藻类脂肪酸标志物与另外两种标志物呈负相关。

不同取样时期的刺参样品在第一、二主成分上的分量如图 5。由图可以对不同季节刺参的食物来源组成情况进行综合分析。根据脂肪酸标

志物可将不同采样时间的刺参分为不同的区。1 月 24 日的样品位于第一主成分的最右端、第二主成分的最上端, 以高含量的硅藻脂肪酸标志物 [$16:1(n-7)/16:0$, EPA]、鞭毛藻或原生动物脂肪酸标志物 (DHA) 和褐藻脂肪酸标志物 [$20:4(n-6)$]、细菌脂肪酸标志物 [$18:1(n-7)$] 与其它日期的样品区别开。3 月 29 日的样品位于第一主成分的最右端、第二主成分的最下端, 因其高含量的硅藻脂肪酸标志物 [$16:1(n-7)/16:0$, EPA]、鞭毛藻或原生动物脂肪酸标志物 (DHA) 和大型绿藻脂肪酸标志物 ($\Sigma [18:2(n-6) + 18:3(n-3)]$) 与其它样品分开。2007 年 6 月样品的大型绿藻脂肪酸标志物 ($\Sigma [18:2(n-6) + 18:3(n-3)]$) 很高。7 月的样品细菌脂肪酸标志物 (Odd & br FAs) 和大型绿藻脂肪酸标志物 ($\Sigma [18:2(n-6) + 18:3(n-3)]$) 偏高。8、

9月样品的细菌脂肪酸标志物(Odd & br FAs)含量很高。10、11月的样品具有较高的褐藻脂肪酸标志物[20:4($n-6$)]、细菌脂肪酸标志物[18:1($n-7$)]。

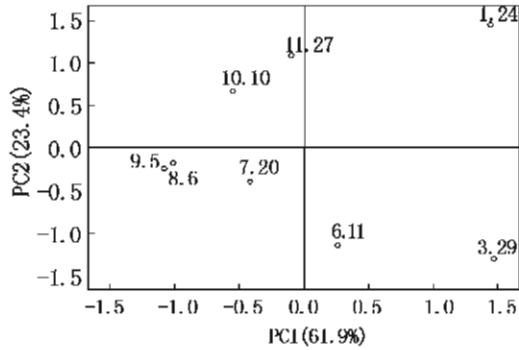


图5 刺参不同季节食物组成的主成分分析

Fig. 5 The principal component analysis of food resources in *A. japonicus* of different seasons

1月份刺参的主要食物组成是硅藻、鞭毛藻或原生动物、褐藻以及变形细菌;3月份刺参的主要食物组成是硅藻、鞭毛藻或原生动物和大型绿藻;6月份大型绿藻在刺参的食物来源中占据较大比重;7月份噬纤维菌—黄杆菌类和大型绿藻在刺参食物来源中占的比重较大;噬纤维菌—黄杆菌类细菌在8-9月份的食物组成中占较大比重;褐藻和变形细菌在10、11月份的食物贡献较大。

3 讨论

刺参对食物的选择性较低,其消化道内容物以颗粒大小不同的沙泥粒、贝壳片为主,包括混在其中的以硅藻类为主的浮游植物、海藻碎片、多种原生动物、螺类及双壳类的幼贝、桡足类、虾蟹类的脱皮壳、大叶藻及细菌类等^[1]。本研究通过脂肪酸标志法分析发现,硅藻、鞭毛藻或原生动物、褐藻、大型绿藻以及多种异养细菌等都是刺参的可能食物来源,且各个季节食物来源组成显著不同。

底栖硅藻是沉积食性生物最重要的食物来源之一^[26]。本研究中刺参体壁的16:1($n-7$)/16:0比值全年平均值为1.10,而且DHA/EPA比值较低,全年小于1(0.29~0.40),表现出典型的硅藻脂肪酸特征^[5],这表明硅藻是刺参的主要食物来源。两种硅藻脂肪酸标志均表现出明显的

季节变化特征,在冬春季节很高,夏秋季节较低,表明硅藻作为刺参的重要食物来源在冬春季节的食物贡献更大。冬末和春季水温较低,正值硅藻生长旺盛期,硅藻类因此成了刺参冬春季的重要食物组分。鞭毛藻类(主要包括金藻门、裸藻门、隐藻门、甲藻门中的种类)或原生动物体内都含有高含量的DHA,但刺参为沉积食性,其体内DHA可能更多来自于底泥中的原生动物。另一方面,相比于硅藻脂肪酸标志水平,原生动物全年对刺参的食物贡献比率要远小于底栖硅藻。

褐藻脂肪酸标志20:4($n-6$)的相对含量在一周年的实验期间内都很高(4.88%~8.16%),表明褐藻也是刺参重要的食物来源,且其高值出现在秋冬季节。褐藻类为低温类群,在冬春季水温较低时繁盛。沉积食性生物可以通过摄食脱落碎屑获得大型藻类的有机质来源,因此刺参在该时期很可能也是通过这种方式获得了较多的褐藻类食物来源。值得关注的是,富集20:4($n-6$)的能力是棘皮动物的一个重要特征^[14,27]。海洋无脊椎动物20:4($n-6$)的来源除了比较公认的褐藻外^[5,13,22],还有以下几种:某些硅藻类^[8]、沉积物中的原生动物和微型真核细胞(microeukaryotes)、自由生活或内共生的细菌^[28],因此刺参体内20:4($n-6$)的食物来源可能比较复杂,需要更深入的研究来证实。

到了水温较高的6、7月份,池塘中大型绿藻类开始替代褐藻类成为优势类群,该时期刺参食物组成中大型绿藻所占的比例也增加了。

微生物是刺参最重要的饵料之一^[29-30],孙奕等^[31]在刺参消化道内发现了大量的细菌,本文用脂肪酸标志法分析也表明细菌是刺参重要的食物来源。两种细菌脂肪酸标志的相对含量很高,实验期间在11.47%~14.73%之间。7-9月份刺参处于夏眠前期和夏眠期,在这段时间刺参的摄食量很低,但脂肪酸标志指示其体内含有较高比例的噬纤维菌—黄杆菌类有机质来源。笔者推测可能有两个原因:(1)大部分噬纤维菌—黄杆菌类细菌能产生多种胞外水解酶,是降解复杂有机物质如海洋植物细胞壁和甲壳类动物骨骼的最重要生态环节^[32],在高温季节,底质中包括大型褐藻类等多种来源的有机质在噬纤维菌—黄杆菌类的介导下大量腐烂降解,处在夏眠前期的刺参可能将降解过程中的有机碎屑连

同细菌一起摄入体内,成为其食物来源的组成部分。(2)Meziane 等^[33]对几种海洋底栖无脊椎动物 *Corophium volutator*, *Arenicola marina*, *Cerastoderma edule* 的研究发现这些动物在饥饿一周后体内的细菌脂肪酸标志含量仍很高,饥饿沙蚕(*Nereis diversicolor*)的细菌脂肪酸标志相对含量甚至高于现场采集的样品。Meziane 等^[33]等推测认为,饥饿使得动物体内调节细菌群落特异性化合物合成量减少,从而导致动物消化道细菌大量繁殖。刺参在高温季节因摄食量减少而处于饥饿状态,其对肠道内细菌群落的调节能力可能也会降低,导致消化道内细菌大量繁殖。

综上所述,硅藻、鞭毛藻或原生动物、褐藻、大型绿藻以及多种异养细菌等都是刺参的可能食物来源,表明刺参的食谱丰富且对上述食物均具有摄食和同化的能力,这就为刺参养殖专用饲料的配制提供了多种可以选择的原材料,为多元综合养殖模式的建立提供了多种备选生物。由于硅藻、褐藻和多种异养细菌是刺参最重要的饵料来源,它们应成为饲料配制的首选原料。

参考文献:

- [1] 隋锡林. 海参增殖[M]. 北京: 中国农业出版社, 1988.
- [2] Fukuda Y, Naganuma T. Potential dietary effects on the fatty acid composition of the common jellyfish *Aurelia aurita* [J]. *Mar Biol*, 2001, 138(5):1029-1035.
- [3] Péquignat E. Skin digestion and epidermal absorption in irregular and regular urchins and their probable relation to the outflow of spherule-coelomocytes [J]. *Nature (Lond)*, 1966, 210(5034): 397-399.
- [4] Péquignat E. Some new data on skin digestion and absorption in sea urchins and sea stars (*Asterias* and *Hericia*) [J]. *Mar Biol*, 1972, 12(1): 28-41.
- [5] 许强. 贝藻混养系统中贝类食物来源的定量分析 [D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2007.
- [6] Sargent J, Parkes R J, Mueller-Harvey I, et al. Lipid biomarkers in marine ecology [M]// Sleight M A, ed. *Microbes in the sea*. Chichester: Ellis Harwood, 1987.
- [7] Viso A C, Marty J C. Fatty acids from 28 marine microalgae [J]. *Phytochemistry (Oxf)*, 1993, 34:1521-1533.
- [8] Dunstan G A, Volkman J K, Barrett S M, et al. Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae) [J]. *Phytochem*, 1994, 35(1):155-161.
- [9] Sargent J R, Falk-Petersen S. The lipid biochemistry of calanoid copepods [J]. *Hydrobiologia*, 1968, 167/168(1): 101-114.
- [10] Budge S M, Parrish C C, McKenzie C H. Fatty acid composition of phytoplankton, settling particulate matter and sediments at a sheltered bivalve aquaculture site [J]. *Mar Chem*, 2001, 76(4): 285-303.
- [11] Stübing D, Hagen W. On the use of lipid biomarkers in marine food web analyses: An experimental case study on the Antarctic krill, *Euphausia superba* [J]. *Limnol Oceanogr*, 2003, 48(4):1685-1700.
- [12] Bachok Z, Mfilinge P L, Tsuchiya M. The diet of the mud clam *Geloina coxans* (Mollusca, Bivalvia) as indicated by fatty acid markers in a subtropical mangrove forest of Okinawa, Japan [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2003, 292(2):187-197.
- [13] Cook E J, Bell M V, Black K D, et al. Fatty acid compositions of gonadal material and diets of the sea urchin, *Psammechinus miliaris*: trophic and nutritional implications [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2000, 255(2): 261-274.
- [14] Howell K L, Pond D W, Billett D S M, et al. Feeding ecology of deep-sea sea stars (Echinodermata: Asteroidea): a fatty-acid biomarker approach [J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 2003, 255: 193-206.
- [15] Ju S J, Harvey H R. Lipids as markers of nutritional condition and diet in the Antarctic krill *Euphausia superba* and *Euphausia crystallorophias* during austral winter [J]. *Deep-Sea Res II*, 2004, 51(17-19): 2199-2214.
- [16] 许强,杨红生,王红,等. 桑沟湾养殖栉孔扇贝食物来源研究——脂肪酸标志法 [J]. *海洋科学*. 2007, 31(9): 78-84.
- [17] 高菲. 刺参营养成分、食物来源及消化生理的季节变化 [D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2008.
- [18] Kharlamenko V I, Zhukova N V, Khotimchenko S V, et al. Fatty acids as markers of food sources in a shallow-water hydrothermal ecosystem (Kraternaya Bight, Yankich Island, Kurile Islands) [J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 1995, 120: 231-241.

- [19] 李荷芳,周汉秋. 海洋微藻脂肪酸组成的比较研究 [J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(1): 34-40.
- [20] Li X, Fan X, Han J, *et al.* Fatty acids of some algae from the Bohai Sea [J]. *Phytochemistry*, 2002, 59(2): 157-161.
- [21] Khotimchenko S V, Vaskovsky V B, Titlyanova T V. Fatty acids of marine algae from the Pacific coast of North California [J]. *Botanica Marina*, 2002, 45(1): 17-22.
- [22] 李宪瑾, 范晓, 韩丽君, 等. 中国黄、渤海常见大型海藻的脂肪酸组成 [J]. 海洋与湖沼, 2002, 33(2): 215-224.
- [23] Pace M L, Carpenter S R, Cole J J, *et al.* Does terrestrial organic carbon subsidize the planktonic food web in a clear-water lake [J]. *Limnol Oceanogr*, 2007, 52(5): 2177-2189.
- [24] Falch E, Rustad T, Jonsdottir R, *et al.* Geographical and seasonal differences in lipid composition and relative weight of by-products from gadiform species [J]. *J Food Compos Anal*, 2006, 19(6-7): 727-736.
- [25] Gao F, Yang H, Xu Q, *et al.* Phenotypic plasticity of gut structure and function during periods of inactivity in *Apostichopus japonicus* [J]. *Comp Bio Phy Part B*, 2008, 150(3): 255-262.
- [26] 邹宁, 郭小燕, 孙东红, 等. 固定化培养底栖硅藻研究 [J], 中国水产, 2005, 6: 72-73.
- [27] Takagi T, Eaton C A, Ackman R G. Distribution of fatty acids in lipids of the common atlantic sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* [J]. *Can J Fish Aquat Sci*, 1980, 37(2): 195-202.
- [28] Russell N J, Nichols D S. Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria-a dogma rewritten [J]. *Microbiology (UK)*, 1999, 145: 767-779.
- [29] Yingst J Y. The utilization of organic matter in shallow marine sediments by an epibenthic deposit feeding holothurian [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 1976, 23(1): 55-69.
- [30] Moriarty D J W. Bacterial biomass in coral reef sediments ingested by holothurians [C]. Abstract Third International Echinoderm Conference, Sydney, Australia, 1978.
- [31] 孙奕, 陈驷. 刺参体内外微生物组成及其生理特性的研究 [J], 海洋与湖沼, 1989, 20(4): 300-307.
- [32] Reichenbach H, Dworkin M. The order Cytophagales [M]// Balows A, Truper H G, Dworkin M, *et al* Eds. New York: Springer-Verlag, 1991.
- [33] Meziane T, Bodineau L, Retiere C, *et al.* The use of lipid markers to define sources of organic matter in sediment and food web of the intertidal salt-marsh-flat ecosystem of Mont-Saint-Michel Bay, France [J]. *J Sea Res*, 1997, 38(1-2): 47-58.

Seasonal variations of food sources in *Apostichopus japonicus* indicated by fatty acid biomarkers analysis

GAO Fei^{1,2}, XU Qiang¹, YANG Hong-sheng^{1*}

(1. The Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

Abstract: Sea cucumber *Apostichopus japonicus* is a species of deposit feeders with abundant food sources. The analysis of fatty acid biomarkers provides an alternative method of investigating diets, which is not subject to the biases of stomach content analysis. In the present study, 16:1($n-7$)/16:0 and EPA [20:5($n-3$)] were selected as diatom fatty acid biomarkers according to the fatty acid composition in body wall tissues of *A. japonicus*. DHA [22:6($n-3$)], Σ [18:2($n-6$) + 18:3($n-3$)] and 20:4($n-6$) were used as fatty acid biomarkers of flagellate or protozoan alga, Chlorophyta and brown alga respectively; Odd & branched FAs and 18:1($n-7$) were the fatty acid biomarkers of heterotrophic bacteria. Seasonal variations of food sources in sea cucumber *A. japonicus*, sampled from a critical cofferdam aquaculture pond, were determined by fatty acid biomarkers analysis. The results showed the food sources consisted of diatoms, flagellate or protozoan, bacteria, brown alga and Chlorophyta originated organic matters. The sea cucumber *A. japonicus* was characterized by significant diatom markers such as high ratio of 16:1($n-7$)/16:0 (0.73 – 1.82) and EPA contents (7.24% – 14.45%), so diatoms were speculated as one of the main diets. And the two diatom markers showed significant variations during the period of the experiments ($F=8.871$, $P<0.001$; $F=22.882$, $P<0.001$; respectively). The low content of DHA (2.41% – 4.45%) and DHA/EPA ratio (0.29 – 0.40) showed the flagellate or protozoan provided low proportions of diets for *A. japonicus* in the year. The food contribution of Chlorophyta was also low with the biomarker [Σ 18:2($n-6$) + 18:3($n-3$)] changing from 1.51% to 2.28% in the duration of the study. However, the relative contents of brown seaweed biomarker 20:4($n-6$) were also found high in the year (4.88% – 8.16%) with the peak values appearing in autumn and winter. Fatty acid biomarkers specific to bacteria Cytophaga-Flavobacteria and Proteobacteria were also found in considerable amounts in the sea cucumber tissue, which suggested that there was substantial bacterial input into the food of the species. The principal component analysis showed the main food sources of *A. japonicus* changed with seasons. Diatoms, flagellate or protozoan, brown alga and bacteria were the main diets of the sea cucumber in January. The contributions of diatoms, flagellate or protozoan and Chlorophyta were comparatively high in March. Chlorophyta was the most important food for *A. japonicus* in June. The diets of sea cucumber were mainly bacteria and Chlorophyta in July. Bacteria were the most important food source of *A. japonicus* in August and September, and the brown alga and bacteria supplied considerable amounts of food for the sea cucumber from October to November. The present study provides alternative materials for feed research of sea cucumber *A. japonicus*.

Key words: *Apostichopus japonicus*; food source; biomarker; seasonal variation

Corresponding author: YANG Hong-sheng. E-mail: hshyang@126.com