

文章编号: 1000-0615(2018)11-1778-09

DOI: 10.11964/jfc.20171211115

用稳定性同位素技术分析稻—虾系统中不同“碳/氮”投喂方式对克氏原螯虾食性的影响

李 聪^{1,2,3}, 成永旭^{1,2,3}, 管勤壮^{1,2,3}, 奚业文⁴, 李嘉尧^{1,2,3*}

(1. 上海海洋大学, 农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

3. 上海海洋大学, 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海 201306;

4. 安徽省水产技术推广总站, 安徽 合肥 230601)

摘要: 为改善克氏原螯虾在稻—虾共作模式下对稻田中丰富自然资源的利用效率, 本研究通过在饲料中添加碳源(麸皮、葡萄糖)调节饲料“碳/氮”(C/N)分别为8, 12, 16三个组别进行投喂, 利用稳定性同位素技术分析各组克氏原螯虾的食性。结果显示, ①不同C/N投喂组中不同规格成虾肌肉中的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值均较本底显著降低, 成虾肌肉的 $\delta^{13}\text{C}$ 值随投喂饲料C/N的增加而下降, B组不同规格成虾肌肉的 $\delta^{15}\text{N}$ 值均较其他两组高。同一C/N投喂处理组中, 1级小规格成虾肌肉的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值均为最高。②通过食性分析, 组A中不同规格的克氏原螯虾的第一食物来源均为饲料, 占比38.03%~44.17%, 组B中饲料仍为不同规格克氏原螯虾的第一食物来源, 但是占比下降为22.13%~25.35%, 组C中1级小规格成虾中有机碎屑为第一食物来源, 占19.93%, 2级中规格成虾及3级大规格成虾的第一食物来源饲料进一步下降为18.85%和19.40%, 组B及组C中浮游动物、藻类、喜旱莲子草等天然饵料食物来源占比均较组A显著增加。研究表明, 通过优化C/N的投喂模式, 可以提高克氏原螯虾对于稻田天然饵料的利用率, 避免饲料的过度使用和浪费, 有利于实现对稻田资源的合理利用。

关键词: 克氏原螯虾; 稻—虾共作; C/N; 稳定性同位素技术; 食性分析

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)适应性强, 是中国重要的淡水养殖品种^[1]。近年来中国克氏原螯虾产业呈现爆炸式的增长, 2016年克氏原螯虾养殖产量85.23万t, 较2015年同比增加17.85%, 超越中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)和凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)成为我国甲壳类淡水养殖第一品种^[2]。目前克氏原螯虾主要为池塘养殖及稻—虾综合种养模式, 其中稻—虾综合种养模式在湖北潜江等地取得了很高的生态效益和经济效益^[3]。稻田中天然饵料极为丰富, 包含大量

的动植物饵料, 蕴藏着不可忽视的自然资源和初级生产力^[4]。

克氏原螯虾为杂食性, 摄食高等水生植物、丝状藻类、小鱼小虾、底栖动物及腐殖质^[5], 根据这一特点, 可以对稻田环境中的丰富天然饵料进行利用。为了提高稻田中克氏原螯虾的品质和产量, 养殖中往往会在稻田的环沟中投喂一定量的饲料, 由于克氏原螯虾的杂食性, 环沟中会存在饲料投喂过量的情况, 加之水产动物的大量排泄物, 较低的能量传递效力使氮

收稿日期: 2017-12-29 修回日期: 2018-03-27

资助项目: 上海市科委农业领域科技支撑项目(15391912100); 江苏省渔业科技类项目(D2017-1-1); 上海高校水产学高峰学科建设专项(2015-62-0908)

通信作者: 李嘉尧, E-mail: jy-li@shou.edu.cn

元素以污染物的形式残留于环沟中的底泥或排放于外环境中^[6], 从而引发养殖病害并对环境造成污染。

向养殖系统中添加有机碳源是一种提高养殖产量和饵料利用率的有效手段^[7]。C/N的提高, 会使养殖水体中的氮被细菌获取, 并用来合成菌体的蛋白质, 当环境内的溶解氧条件及搅动条件达到一定程度后, 也可生成生物絮凝供养殖动物食用, 并且在一定程度上可改善养殖水的环境^[8]。目前在水产养殖中一般通过在饵料中添加有机碳源的方式来调节C/N, 也可直接向养殖水体中投放各种形式的碳源来提高C/N^[9-10]。

针对克氏原螯虾对于稻田系统中的自然资源及投喂饵料利用情况, 目前还未有较为完整的研究, 并未得出一个合理的投喂模式。稳定性同位素技术是近年来用于研究动物食性的有效手段, 已应用于水生动物中, 如鲤(*Cyprinus carpio*)^[11]、鳙(*Aristichthys nobilis*)^[12]、马氏珠母贝(*Pinctada fucata martensii*)^[13]等。由于较难准确通过水生动物肠道解剖法从内容物直接分辨所食用食物种类, 且通过此方法仅能判断短时间内所摄食的较难消化的食物^[14-15]。此技术是根据消费者的稳定性同位素比值与其食物相应的稳定性同位素比值相近的原则来确定食物来源及贡献度^[16]。运用稳定性同位素技术可以分析一段时间内该动物的食性, 以及不同生长阶段食性的变化情况^[17]。

该研究在稻—虾种养环境中, 通过在饲料中添加碳源, 调节投喂饵料的C/N, 高效利用投喂及环境中的氮元素, 并改善克氏原螯虾对于稻田中自然资源的利用效率, 利用稳定性同位素的技术测定不同投喂模式下不同规格克氏原螯虾的各种可能食物来源的贡献率, 从而达到节约饲料、提高饵料利用率、合理利用稻田自然资源的目的。

1 材料与方法

1.1 实验区概况

该实验于2016年8月—12月在上海海洋大学崇明供台蟹种基地(31°36'N, 121°36'E)进行, 此区域属亚热带季风气候。实验期间养殖水温度为10.4~33.5℃, pH值为7.23~8.81, 溶解氧为2.61~10.89 mg/L, 氨氮<0.3 mg/L, 亚硝酸盐<0.10 mg/L。

1.2 实验设计及养殖管理

选取12个实验田, 每个实验田(长×宽=12.5 m×10 m), 中部种植水稻的平台(长×宽=10.3 m×7.4 m), 四周为“回”字型环沟, 环沟中铺设增氧管, 独立进排水。实验分为3个处理组, 组A(饲料组C/N=8); 组B(饲料麸皮组C/N=12); 组C(饲料麸皮葡萄糖组C/N=16), 每组设立4个重复。水稻于2016年7月31日插秧, 插秧前每666.67 m²施用3 kg复合肥、3 kg磷肥。在环沟内均匀地移植适量的喜旱莲子草(*Alternanthera philoxeroides*), 喜旱莲子草面积占环沟面积的30%。于2016年8月20日每个塘放养2.5 kg平均规格为(5±2) g的克氏原螯虾幼虾。

实验期间, 每天傍晚5—6点投喂虾重5%的饲料, 颗粒饲料成分见表1。初始投喂量: A组250 g颗粒饲料(浙江欣欣饲料有限公司)/塘; B组[107 g

表 1 实验所用饲料的原料组成和生化成分

Ingredients and biochemical composition of experimental diets		%
成分 ingredients		含量 content
原料组成 ingredients		
鱼粉 fish meal		4.00
小麦粉 wheat meal		28.30
46%豆粕 46% soybean meal		8.00
菜粕 rapeseed meal		27.50
花生粕 peanut meal		8.00
虾粉 shrimp powder		0.30
棉粕 cotton dregs		6.00
乌贼粉 cuttlefish powder		3.00
啤酒酵母粉 beer yeast powder		1.50
Ca (H ₂ PO ₄) ₂ calcium biphosphate		1.00
磷脂 phospholipid		2.00
膨润土 swell soil		8.00
50% 氯化胆碱 50% choline chloride		0.40
食盐 salt		0.20
营养组成 proximate composition		
水分 moisture		8.36
粗蛋白(干重) crude protein		28.60
总脂(干重) total lipid		4.34
灰分(干重) ash		4.04

颗粒饲料+143 g麸皮(崇明天成饲料有限公司)]/塘; C组[107 g颗粒饲料+143 g麸皮+5 g葡萄糖(国药集团化学试剂有限公司)]/塘, 根据克氏原螯虾长势和天气状况灵活调整投喂量。阴雨天底部增氧机每天晚上8点左右开启曝气, 次日早上6点关闭。

1.3 样品采集和处理

水稻插秧1个月, 幼虾投放半个月, 稻田环境处于稳定状态后开始进行样品采集。由于克氏原螯虾为杂食性甲壳动物, 通过高通量测序对后期成虾胃肠道内容物进行检测, 从而确定采集的食源是否真正被食用。

克氏原螯虾 投放幼虾前, 保留部分样品, 取尾腹部肌肉作为本底。于2016年12月初开始进行共作期间克氏原螯虾成虾样品采集, 通过地笼进行捕获, 每个实验塘至少捕获20只健全的克氏原螯虾。对采集到的克氏原螯虾进行体长、体质量的测量, 根据其体质量分为3个等级: 1级小规格(25~35 g), 2级中规格(35~45 g), 3级大规格(45 g以上), 分别解剖克氏原螯虾尾腹部肌肉, 用去离子水清洗, 并用冷冻干燥机冻干存入自封袋。

喜旱莲子草 分多次对稻田内的喜旱莲子草新生嫩叶进行采集, 采集的嫩叶带回实验室用清水缓慢反复冲洗, 去除表面的泥土, 晾干, 60 °C烘干至恒重, 保存于自封袋。

浮游动物 先用5 L的采水器采集环沟中的稻田水, 然后用13#浮游动物网(孔径0.112 mm)过滤大型浮游动物, 保留浮游动物于聚乙烯瓶中, 回到实验室后用450 °C灼烧4 h的铝箔包存。

有机碎屑 将过滤过浮游动物的水样经预烧的玻璃纤维滤膜(GF/F Whatman, 直径47 mm, 孔径0.7 μm)过滤获得颗粒有机物样品(POM)及浮游植物, 用铝箔包存。

藻类 以丝状绿藻为主的水绵、青苔的收集分别取自水稻基部以及在稻田中漂浮的, 带回实验室后用微流水反复冲洗干净, 置于培养皿中60 °C烘干至恒重, 转移至自封袋。

饲料、麸皮 收集投喂的饲料和麸皮, 在烘箱内60 °C烘干至恒重。

所有样品置于-20 °C冰箱保存备用。将烘干的喜旱莲子草、水绵及青苔、饲料、麸皮、冻干克氏原螯虾肌肉转移至混合型球磨机(Retsch MM440)中磨成粉末。所有滤膜样品用1 mol/L的

盐酸酸化处理。

1.4 稳定性同位素分析

所有样品稳定性同位素测定在上海海洋大学摄食生态学实验室进行, 所有样品用铝箔包被(肌肉样品包被1.5 mg, 其他样品2 mg)。送入稳定性同位素质谱仪(ISOPRIME 100, Isoprime Corporation, Cheadle, UK)进行分析。碳、氮稳定同位素值分别以国际通用的标准物质PDB(美洲拟箭石)和空气N₂作为参考标准, 碳、氮稳定性同位素值以δ¹³C和δ¹⁵N形式来表示。δ¹³C和δ¹⁵N以下的公式进行计算:

$$\delta X (\%) = [(R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}}) - 1] \times 1000$$

式中X为¹³C或¹⁵N; R_{sample}是样本的同位素比值¹³C/¹²C或¹⁵N/¹⁴N, R_{standard}是标准品的同位素比值¹⁸。每测定10个样品插入1个标准品, 使用国际标准品USGS 24(-16.049‰ VPDB)和USGS 26(53.7‰ VN₂)分别校准碳、氮稳定同位素, 分析精度为0.05‰(δ¹³C)、0.06‰(δ¹⁵N), 并随机挑选1个样品进行复测。

实验中所用饵料的C元素和N元素含量由上海交通大学分析测试中心测得, 仪器(Vario EL Cube, 德国Elementar公司), 检测限: 0.01%, 方法为动态燃烧法。

1.5 数据处理

采用SPSS 18.0分析所获得的数据。采用单因素均值方差分析比较不同C/N投喂模式下食源的δ¹³C或δ¹⁵N的差异, 比较不同C/N投喂模式下不同规格克氏原螯虾成虾的δ¹³C或δ¹⁵N的差异, 显著性水平P<0.05。采用IsoSource线性混合模型分析不同食源对消费者的食源贡献率¹⁹。模型计算时, 采用的Increment值和Tolerance值分别为2%和0.01%。由于实验中克氏原螯虾作为稻田环境中的相对高级消费者, 且为杂食性动物。相对于稻田中所摄食的基准物质如喜旱莲子草、浮游动物、有机碎屑等而言, 高出一个营养级, 且食物中蛋白含量较高(如饲料), 根据以往研究, 当环境中基准物质较为确定, 营养级关系确定的情况下, 且测定消费者组织为肌肉部分, 由超过90 d生长周期的肌肉组织来呈现其组织内有机物质的转化, 相邻营养级δ¹⁵N的分馏系数(discrimination factor)即Δ取值3.4‰²⁰⁻²¹, 根据McCutchan等²¹的结论, 当水生杂食性动物取样为消

费者肌肉组织, 且不经过去脂处理的情况下, $\delta^{13}\text{C}$ 的分馏系数即 Δ 取值 $1.3\text{‰} \pm 0.3\text{‰}$ 。

2 结果

2.1 碳、氮同位素组成

各个实验组中的不同规格克氏原螯虾肌肉的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值如表2所示, 表中数据 $\text{mean} \pm \text{SE}$ 表示, 不同 C/N 投喂组中不同规格成虾肌肉的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值均较本底显著降低 ($P < 0.05$)。其中 $\delta^{13}\text{C}$ 值在不同规格的克氏原螯虾肌肉中, 均随着

投喂饵料 C/N 的升高而降低, 且 $\delta^{13}\text{C}$ 在不同规格的克氏原螯虾肌肉中均呈现出组 A 与组 C 之间存在显著性差异 ($P < 0.05$), 组 B 与组 A、组 C 之间无显著性差异 ($P > 0.05$); $\delta^{15}\text{N}$ 值在不同规格的克氏原螯虾肌肉中, 3 个投喂组之间均无显著性差异 ($P > 0.05$), $\delta^{15}\text{N}$ 值在不同规格克氏原螯虾的肌肉中均为组 B > 组 C > 组 A (图1, 图2, 图3); 在同一 C/N 投喂处理组中, 不同规格的克氏原螯虾肌肉的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值之间均无显著性差异 ($P > 0.05$), 且同一 C/N 投喂组中, 1 级小规格克氏原螯虾肌肉的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值均为最高。

表 2 不同投喂组 1 级、2 级、3 级克氏原螯虾肌肉碳、氮同位素含量方差分析

Tab. 2 Variance analysis results of muscle stable carbon and nitrogen isotope of different size *P. clarkii* population of different feeding treatments

稳定性同位素 stable isotopes	组 A group A	组 B group B	组 C group C
碳同位素值(1级) $\delta^{13}\text{C} \text{‰}$ (small size)	-24.28 ± 0.23^a	-24.44 ± 0.18^{ab}	-24.88 ± 0.07^b
氮同位素值(1级) $\delta^{15}\text{N} \text{‰}$ (small size)	6.44 ± 0.11^a	6.60 ± 0.10^a	6.47 ± 0.18^a
碳同位素值(2级) $\delta^{13}\text{C} \text{‰}$ (middle size)	-24.38 ± 0.31^a	-24.76 ± 0.22^{ab}	-25.24 ± 0.20^b
氮同位素值(2级) $\delta^{15}\text{N} \text{‰}$ (middle size)	6.29 ± 0.10^a	6.53 ± 0.11^a	6.41 ± 0.15^a
碳同位素值(3级) $\delta^{13}\text{C} \text{‰}$ (large size)	-24.45 ± 0.13^a	-24.81 ± 0.27^{ab}	-25.15 ± 0.25^b
氮同位素值(3级) $\delta^{15}\text{N} \text{‰}$ (large size)	6.33 ± 0.14^a	6.55 ± 0.10^a	6.38 ± 0.08^a

注: 同行标有不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同

Notes: in the same row, values with different small letter mean significant differences ($P < 0.05$), the same below

克氏原螯虾本底的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值分别为 $7.15\text{‰} \pm 0.05\text{‰}$ 和 $-23.27\text{‰} \pm 0.09\text{‰}$, 饲料的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值分别为 $1.64\text{‰} \pm 0.04\text{‰}$ 和 $-25.92\text{‰} \pm 0.06\text{‰}$, 麸皮的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值分别为 $1.95\text{‰} \pm 0.05\text{‰}$ 和 $-27.61\text{‰} \pm 0.03\text{‰}$ 。

2.2 不同 C/N 投喂组各规格克氏原螯虾的贡献率

通过 IsoSource 线性混合模型计算, 得出在稻—虾综合种养系统的稻田环境中, 可能的食物来源在不同 C/N 投喂处理组中不同规格克氏原螯虾的贡献率。

组 A 中不同规格克氏原螯虾的第一食物来源均为饲料, 平均占比 $38.03\% \sim 44.17\%$ (以下食物来源贡献率均为平均占比), 其次为有机碎屑 ($21.18\% \sim 23.40\%$), 克氏原螯虾本底占比最少 ($4.27\% \sim 6.47\%$), 其 3 种可能的食物来源浮游动物、喜旱莲子草、藻类占比较为均匀, 在 10% 左右; 3 级大规格克氏原螯虾中虾本底及浮游动物等动物性饵料占比略高于其他 2 个规格, 1 级小规格克氏原螯虾中

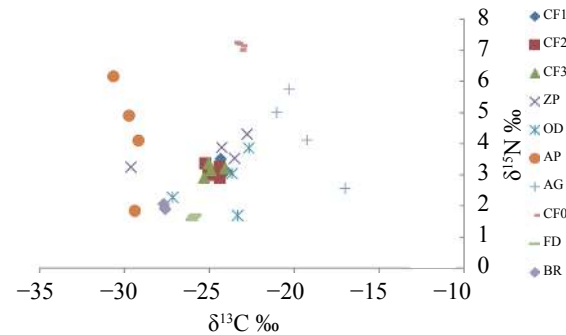


图 1 组 A 不同规格克氏原螯虾肌肉及可能食源的碳、氮稳定性同位素组成

CF1. 1 级克氏原螯虾; CF2. 2 级克氏原螯虾; CF3. 3 级克氏原螯虾; ZP. 浮游动物; OD. 有机碎屑; AP. 喜旱莲子草; AG. 藻类; CF0. 克氏原螯虾本底; FD. 饲料; BR. 麸皮; 下同

Fig. 1 Stable isotopes composition of different size *P. clarkii* and possible food source in group A

CF1. small *P. clarkii*; CF2. middle *P. clarkii*; CF3. large *P. clarkii*; ZP. zooplankton; OD. organic debris; AP. *A. philoxeroides*; AG. algae; CF0. *P. clarkii* background; FD. feed; BR. bran; the same below

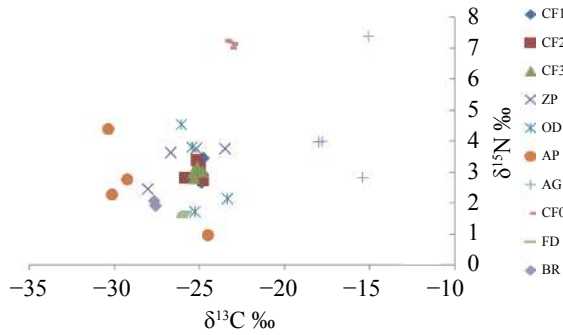


图2 组B不同规格克氏原螯虾肌肉及可能食源的碳、氮稳定性同位素组成

Fig. 2 Stable isotopes composition of different size *P. clarkii* and possible food source in group B

喜旱莲子草及藻类等植物性饵料占比略高于其他2个规格(表3)。

组B中饲料仍为不同规格克氏原螯虾的第一食物来源,但是占比较组A下降为22.13%~25.35%,占比第二的仍为有机碎屑,较组A下降为17.56%~19.82%,麸皮占比为12.95%~16.22%,其他各种食源均较组A有所增加;1级小规格克氏原螯虾

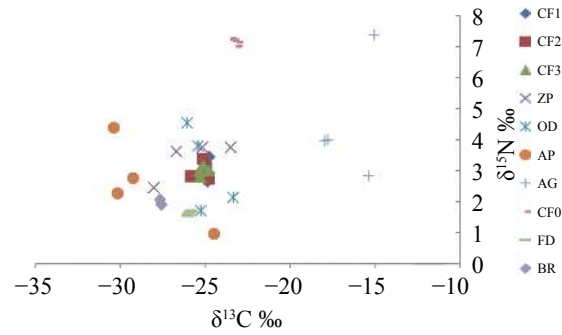


图3 组C不同规格克氏原螯虾肌肉及可能食源的碳、氮稳定性同位素组成

Fig. 3 Stable isotopes composition of different size *P. clarkii* and possible food source in group C

中有机碎屑和藻类的食物来源占比高于其他较大规格,3级大规格克氏原螯虾中喜旱莲子草及麸皮的食物来源占比高于较小规格(表4)。

组C中不同规格克氏原螯虾的第一食物来源有所变化(表5),在1级小规格克氏原螯虾中有机碎屑为第一食物来源,占19.93%±4.56%,2级中规格克氏原螯虾及3级大规格克氏原螯虾的第一

表3 组A不同规格克氏原螯虾食谱中各组分贡献率

Tab. 3 The contributions of different components of group A (C/N:8) to different sizes *P. clarkii* dietary %

食物来源 food source	本底 <i>P. clarkii</i> background	饲料 feed	浮游动物 zooplankton	有机碎屑 organic debris	喜旱莲子草 <i>A. philoxeroides</i>	藻类 algae
贡献率(1级) contribution rate (small size)	5.95±0.26	41.40±9.41	11.15±2.08	21.18±2.10	9.17±3.95	11.15±3.05
贡献率(2级) contribution rate (middle size)	4.28±0.91	44.17±12.23	11.77±2.59	23.40±7.05	6.00±3.24	10.38±1.81
贡献率(3级) contribution rate (large size)	6.47±2.12	38.03±14.33	14.42±4.15	23.20±3.13	7.45±4.48	10.43±3.93

表4 组B不同规格克氏原螯虾食谱中各组分贡献率

Tab. 4 The contributions of different components of group B (C/N:12) to different sizes *P. clarkii* dietary %

食物来源 food source	本底 <i>P. clarkii</i> background	饲料 feed	浮游动物 zooplankton	有机碎屑 organic debris	喜旱莲子草 <i>A. philoxeroides</i>	藻类 algae	麸皮 bran
贡献率(1级) contribution rate (small size)	8.15±6.30	22.13±5.78	13.97±4.92	19.82±8.15	8.55±4.17	14.42±5.99	12.95±1.67
贡献率(2级) contribution rate (middle size)	8.67±6.89	25.35±8.48	14.43±4.31	17.68±4.09	9.15±4.14	10.50±0.96	14.22±2.08
贡献率(3级) contribution rate (large size)	7.97±5.86	23.40±6.49	14.08±2.84	17.56±5.62	9.97±5.08	10.80±3.04	16.22±3.37

表5 组C不同规格克氏原螯虾食谱中各组分贡献率

Tab. 5 The contributions of different components of group C (C/N:16) to different sizes *P. clarkii* dietary %

食物来源 food source	本底 <i>P. clarkii</i> background	饲料 feed	浮游动物 zooplankton	有机碎屑 organic debris	喜旱莲子草 <i>A. philoxeroides</i>	藻类 algae	麸皮 bran
贡献率(1级) contribution rate (small size)	8.82±4.24	18.95±6.21	14.9±4.84	19.93±4.56	11.10±1.22	10.53±5.78	15.73±1.78
贡献率(2级) contribution rate (middle size)	8.95±5.29	18.85±4.76	16.87±4.25	17.57±5.87	12.00±1.58	8.37±4.03	17.4±3.98
贡献率(3级) contribution rate (large size)	7.92±2.78	19.40±3.10	15.1±0.56	16.77±5.14	13.65±1.95	9.85±2.24	17.25±2.06

食物来源饲料分别占 $18.85\% \pm 4.76\%$ 和 $19.40\% \pm 3.10\%$, 饲料和有机碎屑仍然占据食源贡献率的前2位, 1级小规格克氏原螯虾中喜旱莲子草和麸皮的食物来源占比略低于其他2种大规格, 有机碎屑占比高于其他2种大规格, 3级大规格克氏原螯虾中喜旱莲子草的食源占比高于其他2个小规格组。

3 讨论

3.1 克氏原螯虾 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值变化

本研究表明, 在为期4个月的稻—虾共作养殖实验中, 克氏原螯虾的肌肉中稳定性同位素 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值会随着食物中稳定性同位素 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值的变化而发生相应的变化, 通过克氏原螯虾肌肉和可能摄取食物的稳定性同位素 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值来分析稻田中克氏原螯虾的摄食情况^[22-23]。该研究测得的克氏原螯虾肌肉的 $\delta^{15}\text{N}$ 值与Whitledge等^[24]研究的克氏原螯虾成虾肌肉的 $\delta^{15}\text{N}$ 值接近, 均为 6.5% 左右, 但 $\delta^{13}\text{C}$ 值较其有所增加, 可能与崇明地区位于长江入海口有关, 有研究表明海滨地区及河口的 $\delta^{13}\text{C}$ 值会有所富集^[25]。

从克氏原螯虾肌肉的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值分析, 随着投喂饵料C/N的增加, 不同组别不同规格克氏原螯虾肌肉的 $\delta^{13}\text{C}$ 值都会随之降低, 这与不同C/N投喂模式的稻—虾种养系统中克氏原螯虾的食性差异相关, 由于C/N较高的组别中的克氏原螯虾摄食了更多的如麸皮、喜旱莲子草、浮游动物等 $\delta^{13}\text{C}$ 值相对较低的食物, 并且减少摄食了 $\delta^{13}\text{C}$ 值相对较高的饲料及有机碎屑。成虾肌肉的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值相较于养殖初期投放的幼虾本底肌肉的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值而言均有所降低, 刚孵出的仔虾以自身的卵黄为主要营养物质, 之后不久改为摄食小型的轮虫、枝角类、摇蚊幼虫及藻类, 前期的初级食物来源中 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值均较高, 随着克氏原螯虾体型的增大, 食性逐渐转变为 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值相对较低的大型水生植物、有机碎屑^[26], 及本研究中所投喂的饲料及麸皮等, 这些食物来源的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值对克氏原螯虾肌肉的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值起到了一定的稀释作用^[27]。

3.2 克氏原螯虾的营养级

不同规格的克氏原螯虾之间的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值无显著性差异, 说明达到成虾规格以后的克氏原螯虾随着体质量的进一步增加, 肌肉的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值并没有呈现出显著的富集效应。不同组别

的不同规格克氏原螯虾肌肉的 $\delta^{15}\text{N}$ 值均无显著性差异, 且差值均不超过 3.4% , 说明各组别中各规格的克氏原螯虾都处于同一营养级的同一营养水平^[21]。从有机碎屑 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值在不同组别的散点图分析, 它总是位于散点图的中心位置, 并且是较为密集的位置, 与克氏原螯虾肌肉的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值有很多区域重叠的情况, 既说明了有机碎屑是水生植物、浮游动植物、昆虫等残体的聚集物^[16], 又说明了在稻田生态系统中, 即使投喂饲料, 克氏原螯虾仍会摄取大量天然饵料。

3.3 克氏原螯虾的食性

通过对克氏原螯虾肌肉及各食源 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值的分析, 以及对虾肠道内容物的高通量测序, 得知以上所有食物克氏原螯虾均有摄食, 从而得到不同组别不同食物来源的贡献率。组A中不同规格成虾均以饲料为主要食物来源, 平均贡献率为 $38.03\% \sim 44.17\%$, 可能与该组别饲料的投喂量相对其他2组较多, 且饲料的适口性和易得性^[28]较高有关。随着投喂饵料C/N的增加, 各种规格克氏原螯虾所食用的饲料作为食物来源的比例显著下降, 组B饲料贡献率为 $22.13\% \sim 25.35\%$, 组C进一步下降为 $18.85\% \sim 19.40\%$ 。这可能与C/N增加, 更适宜生物絮团的生成有关。经研究发现, 生物絮团主要由残余饵料、浮游动物、藻类及有机碎屑组成^[29-30], 本研究中发现B、C组中形成的絮状物附着在喜旱莲子草茎叶上, 被克氏原螯虾刮食, 此现象也印证了本研究中B、C组浮游动物、藻类、有机碎屑的总体贡献率及喜旱莲子草的单独贡献率增高的结论; 此外, 还发现随着投喂饵料C/N的增加, 对于克氏原螯虾本底的摄食比例显著增加, 可能与其尸体形成部分腐殖质及生物絮团相关。

不同规格克氏原螯虾对食源选择也存在差异。低C/N投喂组中呈现出小规格虾的喜旱莲子草贡献率大于大规格, 由于大规格虾在摄食竞争中处于优势, 优先摄取了大量饲料, 小规格虾则选择喜旱莲子草及藻类进行食物补充。而在高C/N投喂组中喜旱莲子草及麸皮贡献率呈现出大规格多于小规格, 可能由于该组别中絮团的生成使得克氏原螯虾对于不同饵料的摄食更为均匀, 饲料的贡献率降低, 不同规格虾对于饲料的竞争减少, 大规格虾由于自身食量较高, 更多的利用了易摄取的麸皮及喜旱莲子草。此外, 高C/N投喂组, 各规格克氏原螯虾的本底贡

献率无显著差异,说明在高C/N投喂组,克氏原螯虾的互残不是本底贡献率上升的主要原因^[31],可能与尸体残骸参与絮团形成更为相关。由此可以看出,不同规格虾之间食性的差异多受食量差异、食源易得性和适口性影响。

综上所述,本研究通过提高投喂饵料的C/N,可以提高克氏原螯虾在稻田环境中对于天然饵料的利用率,达到节约投喂成本,降低环境污染的作用。后期还需要对于不同投喂模式下的克氏原螯虾营养状况及产量进行分析,在降本增效的同时也为今后克氏原螯虾颗粒饲料配方的进一步优化提供参考。

参考文献:

- [1] 慕峰,吴旭干,成永旭,等.克氏原螯虾胚胎发育的形态学变化[J].水产学报,2007,31(S1):6-11.
Mu F, Wu X G, Cheng Y X, et al. External morphological character during the embryonic development of *Procambarus clarkii*[J]. Journal of Fisheries of China, 2007, 31(S1): 6-11(in Chinese).
- [2] 农业部渔业渔政管理局.中国渔业统计年鉴-2017-[M].北京:中国农业出版社,2017.
The Ministry of Agriculture Fishery and Fishery Administration. China Fishery Statistical Yearbook [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2017 (in Chinese).
- [3] 陶忠虎,周滢,周多勇,等.虾稻共生生态高效模式及技术[J].中国水产,2013(7):68-70.
Tao Z H, Zhou X, Zhou D Y, et al. Rice-crayfish coculture eco-efficient mode and technology[J]. China Fisheries, 2013(7): 68-70(in Chinese).
- [4] Halwart M. Biodiversity and nutrition in rice-based aquatic ecosystems[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2006, 19(6-7): 747-751.
- [5] 谢文星,董方勇,谢山,等.克氏原螯虾的食性、繁殖和栖息习性研究[J].水利渔业,2008,28(4):63-65.
Xie W X, Dong F Y, Xie S, et al. Study on feeding, reproduction and habit of *Procambarus clarkii*[J]. Reservoir Fisheries, 2008, 28(4): 63-65(in Chinese).
- [6] Jackson C, Preston N, Thompson P J, et al. Nitrogen budget and effluent nitrogen components at an intensive shrimp farm[J]. Aquaculture, 2003, 218(1-4): 397-411.
- [7] Hargreaves J A. Photosynthetic suspended—growth systems in aquaculture[J]. Aquacultural Engineering, 2006, 34(3): 344-363.
- [8] Burford M A, Lorenzen K. Modeling nitrogen dynamics in intensive shrimp ponds: the role of sediment remineralization[J]. Aquaculture, 2004, 229(1-4): 129-145.
- [9] Asaduzzaman M, Salam M A, Wahab M A, et al. Effects of control of C/N ratio by low-cost carbohydrate addition on water quality and pond ecology in freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* post-larvae nursing system[J]. Bangladesh Journal of Fisheries Research, 2006.
- [10] Crab R, Chielens B, Wille M, et al. The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae[J]. Aquaculture Research, 2010, 41(4): 559-567.
- [11] Carvalho D R, Castro D, Callisto M, et al. Isotopic variation in five species of stream fishes under the influence of different land uses[J]. Journal of Fish Biology, 2015, 87(3): 559-578.
- [12] 李学梅,朱永久,王旭歌,等.稳定同位素技术分析不同养殖方式下鳙饵料的贡献率[J].中国水产科学,2017,24(2):278-283.
Li X M, Zhu Y J, Wang X G, et al. Using a stable isotope ratio to evaluate the contribution of food to bighead carp (*Aristichthys nobilis*) subjected to different breeding methods[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(2): 278-283(in Chinese).
- [13] Fukumori K, Oi M, Doi H, et al. Food sources of the pearl oyster in coastal ecosystems of Japan: evidence from diet and stable isotope analysis[J]. Estuarine Coastal and Shelf Science, 2008, 76(3): 704-709.
- [14] 徐军,张敏,谢平.氮稳定同位素基准的可变性及对营养级评价的影响[J].湖泊科学,2010,22(1):8-20.
Xu J, Zhang M, Xie P. Variability of stable nitrogen isotopic baselines and its consequence for trophic modeling[J]. Journal of Lake Sciences, 2010, 22(1): 8-20(in Chinese).
- [15] 薛彬,蒋日进,王凯,等.应用稳定同位素技术分析枸杞岛近岸海域褐菖鲈的食性[J].水产学报,2017,41(9):1415-1423.
Xue B, Jiang R J, Wang K, et al. Feeding habits of *Sebastes marmoratus* in the Gouqi Island based on stable isotope analysis[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(9): 1415-1423(in Chinese).
- [16] 徐军.应用碳、氮稳定性同位素探讨淡水湖泊的食物网结构和营养级关系[D].武汉:中国科学院研究生院

- (水生生物研究所), 2005.
- Xu J. Ecological studies on the food web structures and trophic relationships of freshwater lakes in China using stable carbon and nitrogen isotopes [D]. Wuhan: Chinese Academy of Sciences (Institute of Hydrobiology), 2005 (in Chinese).
- [17] 李斌, 王志坚, 金丽, 等. 蒙古鲈食性转变的稳定性同位素研究[J]. 水产学报, 2011, 35(9): 1419-1425.
- Li B, Wang Z J, Jin L, *et al.* Study on diet shift of *Erythroulter mongolicus mongolicus* with stable isotope technology[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(9): 1419-1425(in Chinese).
- [18] 皮坤, 张敏, 李庚辰, 等. 人工饵料对主养黄颡鱼和主养草鱼池塘沉降颗粒有机质贡献的同位素示踪[J]. 水生生物学报, 2014, 38(5): 929-937.
- Pi K, Zhang M, Li G C, *et al.* Carbon and nitrogen stable isotopes as tracers to source artificial organic matter of sedimentary particle in grass carp and yellow catfish poly-cultured ponds[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(5): 929-937(in Chinese).
- [19] Phillips D L, Gregg J W. Source partitioning using stable isotopes: coping with too many sources[J]. Oecologia, 2003, 136(2): 261-269.
- [20] Post D M. Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions[J]. Ecology, 2002, 83(3): 703-718.
- [21] Mccutchan J H J, Lewis W M J, Kendall C, *et al.* Variation in trophic shift for stable isotope ratios of carbon, nitrogen, and sulfur[J]. Oikos, 2003, 102(2): 378-390.
- [22] Peterson B J, Fry B. Stable Isotopes in Ecosystem Studies[J]. Annual Review of Ecology and Systematics, 1987, 18: 293-320.
- [23] Fry B. Food web structure on Georges Bank from stable C, N, and S isotopic compositions[J]. Limnology and Oceanography, 1988, 33(5): 1182-1190.
- [24] Whittleage G W, Rabeni C F. Energy sources and ecological role of crayfishes in an Ozark stream: insights from stable isotopes and gut analysis[J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1997, 54(11): 2555-2563.
- [25] France R L. Stable carbon and nitrogen isotopic evidence for ecotonal coupling between boreal forests and fishes[J]. Ecology of Freshwater Fish, 1997, 6(2): 78-83.
- [26] 徐增洪, 周鑫, 水燕. 克氏原螯虾的食物选择性及其摄食节律[J]. 大连海洋大学学报, 2012, 27(2): 166-170.
- Xu Z H, Zhou X, Shui Y. Food preference and feeding rhythm in red swamp crayfish *Procambarus clarkii*[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2012, 27(2): 166-170(in Chinese).
- [27] 曾庆飞, 谷孝鸿, 毛志刚, 等. 同位素富集—稀释法研究食性转变对鱼类不同组织N同位素转化率的影响[J]. 生态学报, 2012, 32(4): 1257-1263.
- Zeng Q F, Gu X H, Mao Z G, *et al.* Effect of diet switch on turnover rates of tissue nitrogen stable isotopes in fish based on the enrichment—dilution approach[J]. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(4): 1257-1263(in Chinese).
- [28] Alcorlo P, Geigler W, Otero M. Feeding preferences and food selection of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, in habitats differing in food item diversity[J]. Crustaceana, 2004, 77(4): 435-453.
- [29] Salman F M, Elkadi R I, Abdelrahman H, *et al.* Biologically treated sugar beet pulp as a supplement in goat rations[J]. International Journal of Agriculture & Biology, 2008, 10(4): 412-416.
- [30] 赵培. 生物絮团技术在海水养殖中的研究与应用[D]. 上海: 上海海洋大学, 2011.
- Zhao P. The study and application of bioflocs technology in seawater aquaculture[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2011 (in Chinese).
- [31] 陈翔宇, 王陈路, 黄成, 等. 食性对克氏原螯虾格斗行为的影响[J]. 饲料工业, 2014(s1): 117-120.
- Chen X Y, Wang C L, Huang C, *et al.* Feeding habits impact on the agonistic behavior of crayfish(*Procambarus clarkii*)[J]. Feed Industry, 2014(s1): 117-120(in Chinese).

Using stable isotopes to estimate the effects of different carbon/nitrogen feeds on feeding habit of *Procambarus clarkii* in the rice-crayfish co-culture system

LI Cong^{1,2,3}, CHENG Yongxu^{1,2,3}, GUAN Qinzhuang^{1,2,3}, XI Yewen⁴, LI Jiayao^{1,2,3*}

(1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. National Demonstration Centre for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

3. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

4. Fisheries Technology Extension Center of Anhui Province, Hefei 230601, China)

Abstract: In the rice-crayfish co-culture system, natural resources and primary productivity of rice fields are abundant, which provides abundant natural baits for *Procambarus clarkii*. At present, there is no report about the utilization of rice fields with *P. clarkii*. In this paper, C/N was increased by adding carbon source to feed, which makes nitrogen utilization increase and enriches the density of natural baits in rice fields. We designed three feeding modes as group A (formulated diet C/N: 8), group B (formulated diet and bran C/N: 12) and group C (formulated diet, bran and glucose C/N: 16). Stable isotope techniques were used for analyzing the feeding habits of *P. clarkii*. The results showed that: The $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of muscles in different dietary C/N groups were significantly lower than the juvenile *P. clarkii* muscle, and the $\delta^{13}\text{C}$ values of adult *P. clarkii* muscle decreased with the increase of C/N. While the $\delta^{15}\text{N}$ values of *P. clarkii* muscle in group B with different sizes were higher than the other two groups. In the same C/N treatment, the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ value of crayfish muscle of a small size crayfish were the highest. According to the analysis of diet, formulated feed was the first food source of *P. clarkii* with different sizes in group A, accounting for 38.03%-44.17%. Formulated feed was still the first contribution of crayfish diet with different sizes in group B but dropped to 22.13%-25.35%. In group C, the organic debris for the diet of small size *P. clarkii* accounted for 19.93% was the first food source. Formulated feed which was the first food source of middle and large size *P. clarkii* declined further to 18.85% and 19.4% respectively. The natural food proportions including zooplankton, algae and *Alternanthera philoxeroides* were significantly increased in groups B and C compared with group A. The results indicate that by increasing the C/N of feed of rice-crayfish co-culture system, the utilization rate of natural food in the rice fields can be increased, and the excessive use and waste of the feed can be avoided, and it is beneficial to realize the rational utilization of rice fields resources.

Key words: *Procambarus clarkii*; rice-crayfish co-culture; C/N; stable isotopes; diets analysis

Corresponding author: LI Jiayao. E-mail: jy-li@shou.edu.cn

Funding projects: Science and Technology Support Projects of Agriculture from Shanghai Municipal Science and Technology Commission (15391912100); Fishery Science and Technology Project of Jiangsu Province (D2017-1-1); Shanghai Universities Top Disciplines Project of Fisheries from Shanghai Municipal Education Committee and the Technology Commission (2015-62-0908)