



饲料中添加雨生红球藻对黄颡鱼生长、抗氧化酶活性、免疫应答及氨氮耐受的影响

樊玉文¹, 张木子², 黎明^{1*}, 钱云霞¹, 王日昕¹, 姜海波^{2*}

(1. 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211;

2. 贵州大学动物科学学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 为探讨饲料中添加雨生红球藻对黄颡鱼生长、抗氧化酶活性、免疫应答及氨氮耐受的影响, 实验以平均体质量为 (5.00±0.85) g 的黄颡鱼为研究对象, 随机分成 4 个组, 每组 3 个重复, 每个重复 30 尾鱼, 分别投喂添加 0.00% (对照组)、0.30%、0.50% 及 1.00% 雨生红球藻的饲料, 每天 2 次表观饱食投喂, 实验进行 10 周。结果显示, 饲料中雨生红球藻的添加量大于 0.30% 能够显著提高黄颡鱼的增重率和血红蛋白含量, 降低饲料系数和白细胞数; 饲料中添加 0.50% 雨生红球藻能够显著降低黄颡鱼血清超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性及丙二醛含量, 显著提高血清溶菌酶活性; 96 h 急性氨氮暴露实验结果显示, 摄食 0.50%~1.00% 雨生红球藻饲料的黄颡鱼累积死亡率和血氨含量显著低于对照组; 饲料中添加雨生红球藻显著提高了氨氮暴露下黄颡鱼肝脏中氨代谢相关酶含量, 其中, 氨甲酰磷酸合成酶和精氨酸酶含量随着雨生红球藻含量的升高显著提高。研究表明, 饲料中添加大于 0.30% 雨生红球藻能够显著提高黄颡鱼的生长性能, 改善血液健康状况、氧化损伤及免疫应答能力; 饲料中雨生红球藻的添加量超过 0.50% 能够显著提高黄颡鱼在氨氮暴露下的存活率。

关键词: 黄颡鱼; 雨生红球藻; 虾青素; 抗逆; 氨氮

中图分类号: S 963

文献标志码: A

虾青素 (3, 3'-二羟基-4, 4'-二酮基-β, β'-胡萝卜素, Astaxanthin) 作为一种酮式类胡萝卜素, 具有多种重要的生物学功能, 包括提高抗氧化酶活性、增强免疫力及抗病力, 但在水产养殖领域, 更加关注其具有的着色作用^[1-2]。天然虾青素的主要来源是虾蟹类甲壳、藻类和酵母, 其虾青素含量从 0.15% 到 0.40% 不等^[3]。相比之下, 在人为干预下, 雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 可

以积累达干重 5% 的虾青素^[4-6]。雨生红球藻是一种淡水微绿藻, 隶属于绿藻门 (Chlorophyta) 团藻目 (Volvocales) 红球藻科 (Haematococcaceae) 红球藻属 (*Haematococcus*), 因其能够积累高含量的虾青素而具有商业价值。先前的研究表明, 饲料中雨生红球藻的添加量达 3 g/kg 时, 可以显著提高虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 的生长性能、抗氧化酶活性、免疫力及存活率^[3]; 将虹鳟暴露到 9.1

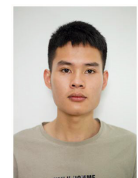
收稿日期: 2021-03-09 修回日期: 2021-07-22

资助项目: 国家自然科学基金 (32072948); 浙江省省属高校基本科研业务费专项 (SJLY2020009); 浙江省重点研发项目 (2019C02049); 宁波市自然科学基金 (202003N412); 贵州大学自然科学基金 (特岗) (2021(26)); 贵州省科技计划项目 (黔科合基础 20191114); 农业农村部淡水生物多样性保护重点实验室开放项目 (LFBC1010)

第一作者: 樊玉文 (照片), 从事鱼类营养生理学研究, E-mail: 1358254128@qq.com

通信作者: 黎明, 从事鱼类营养生理研究, E-mail: liming1@nbu.edu.cn;

姜海波, 从事鱼类营养生理研究, E-mail: jhb99412@126.com



mg/L 砷水体中, 摄食雨生红球藻能够显著降低脂质过氧化水平, 提高抗氧化酶相关基因的表达, 减轻砷暴露造成的氧化应激^[7]。近期在哺乳类研究中发现, 雨生红球藻能够显著降低小鼠血清中尿素氮的含量^[8]。

黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 是一种杂食性鱼类, 在我国各地淡水水域中均有分布。截止 2019 年, 全国黄颡鱼养殖总产量达 536 964 t, 已成为我国重要的淡水养殖品种之一^[9]。然而, 随着高密度集约化养殖模式的迅猛发展, 饵料残渣、排泄物及动物尸体积累造成的氨氮污染已成为常态化。环境中有毒的氨氮经鳃和皮肤进入鱼体后, 导致谷氨酰胺在大脑中大量积累, 通过激活 N-甲基-D-天冬氨酸受体产生大量自由基导致氨氮中毒, 从而影响养殖黄颡鱼的健康及产量, 探寻有效的氨氮解毒策略已成为亟待解决的重要问题。本实验以黄颡鱼为研究对象, 评估了雨生红球藻对其生长性能、血液学状况、抗氧化酶活性、免疫应答及氨氮耐受的影响, 研究成果将为黄颡鱼全价配合饲料的研发提供指导。

1 材料与方 法

1.1 实验饲料

实验饲料以鱼粉、豆粕和小麦蛋白粉为蛋白源, 以鱼油、豆油和大豆卵磷脂为脂肪源, 配置雨生红球藻添加量分别为 0.00% (对照组)、0.30%、0.50% 和 1.00% 的 4 种饲料, 4 种饲料中虾青素含量的实测值依次是 0.00%、0.03%、0.06% 和 0.11%。原料混合均匀后, 经 F-26II 饲料机 (华南理工大学, 广州) 加工成直径分别为 2 和 4 mm 的硬颗粒料, 室温干燥至水分含量 < 10%, 置于密封袋中 -20 °C 保存备用。实验饲料配方及营养水平见表 1。

1.2 实验动物及取样

黄颡鱼幼鱼购自浙江省湖州市某养殖场, 投喂对照组饲料暂养 15 d 后, 挑选大小均匀 (5.00±0.85) g、健康活泼的实验鱼随机分配到 12 个 500 L 塑料养殖桶中, 每桶 30 尾。每种实验饲料投喂 3 桶实验鱼, 采用人工饱食投喂, 每天 2 次 (06:00~07:00 和 17:00~18:00), 养殖实验持续 10 周, 每天记录投喂量。整个实验过程中, 水温 (29.00±2.00) °C, 溶解氧 (7.05±0.52) g/L, pH 6.40~6.60, 氨氮 < 0.01 mg/L, 亚硝酸盐 < 0.50 mg/L, 保持

自然光照。

摄食生长实验结束后, 所有实验鱼饥饿 24 h, 经 MS-222 (120 mg/L) 麻醉后进行称重及计数。每桶随机挑选 3 尾鱼, 切碎, 混合, -20 °C 保存, 用于全鱼粗成分分析; 每桶另选 3 尾鱼, 用肝素 (100 IU/mL) 浸润过的一次性注射器从尾静脉中抽血, 用于血液学测定; 每桶再选 3 尾鱼, 用未经肝素浸润过的一次性注射器从尾静脉中抽血, 4 °C 过夜, 离心 (836×g, 10 min, 4 °C) 获得血清, -80 °C 保存, 用于血清生化指标、抗氧化酶活性及免疫应答指标检测。取血后的 6 尾鱼被解剖获取肝脏, 称重并计算肝体比。

1.3 生化分析

参考 AOAC^[10] 标准方法, 测定实验饲料及全鱼样品中粗蛋白质、粗脂肪、水分及灰分的含量。样品于烘箱中 105 °C 至恒重, 测定水分含量; 碳化后的样品置于马弗炉中 600 °C 至恒重, 测定灰分含量; 蛋白质含量测定采用 FP-528 全自动蛋白质分析仪 (Leco 公司, 美国密歇根); 脂肪含量测定采用 2055 全自动索氏抽提仪 (Foss 公司, 瑞典赫加奈斯)。虾青素的测定采用 Waters 2695 高效液相色谱仪 (Waters 公司, 美国)。参考 Li 等^[11] 描述的方法统计红细胞数、白细胞数、血红蛋白含量及血容积, 采用 AU5800 全自动生化分析仪 (Beckman Coulter, 美国) 测定血清总蛋白、白蛋白、球蛋白、葡萄糖、胆固醇、甘油三酯、谷丙转氨酶及谷草转氨酶含量。血清超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶及丙二醛含量测定采用商业试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 南京)。每毫克蛋白每分钟抑制氯化硝基四氮唑蓝自氧化速率达 50% 时的酶消耗量定义为 1 个超氧化物歧化酶活性单位; 每毫克蛋白每分钟使反应体系吸光度减少 0.1 的酶消耗量定义为 1 个过氧化氢酶活性单位; 1 min 内转化 1 μmol/L 底物的酶量定义为 1 个谷胱甘肽过氧化物酶活性单位。血清溶菌酶以卵白蛋白为标准品, 在室温下, 吸光度值每分钟降低 0.001 定义为一个活性单位; 血清总补体及总免疫球蛋白含量, 测试采用商业试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 南京), 通过酶标仪检测反应液中抗体引起的浊度变化。参考 Li 等^[12] 描述的方法测定血氨、氨甲酰磷酸合成酶、精氨酸酶、谷氨酰胺合成酶及谷氨酸脱氢酶含量, 测试采用 ELISA 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 南京)。采用双抗夹心法, 利用纯化的抗体,

表 1 实验饲料组成及营养水平(干物质基础)
Tab. 1 Composition and nutrient levels of experimental diets (DM basis) %

项目 items	饲料中雨生红球藻添加量 dietary <i>H. pluvialis</i> supplemental level			
	0	0.30	0.50	1.00
原料 ingredients				
鱼粉 fish meal	35.00	35.00	35.00	35.00
豆粕 soybean meal	18.00	18.00	18.00	18.00
小麦蛋白粉 wheat gluten meal	15.00	15.00	15.00	15.00
鱼油 fish oil	2.00	2.00	2.00	2.00
豆油 soybean oil	2.00	2.00	2.00	2.00
大豆卵磷脂 soy lecithin	1.00	1.00	1.00	1.00
维生素预混料 vitamin premix ¹	1.00	1.00	1.00	1.00
矿物质预混料 mineral premix ²	1.50	1.50	1.50	1.50
小麦粉 wheat flour	15.00	15.00	15.00	15.00
磷酸二氢钙 monocalcium phosphate	2.00	2.00	2.00	2.00
氯化胆碱 choline chloride	0.50	0.50	0.50	0.50
甜菜碱 betaine	2.00	2.00	2.00	2.00
纤维素 cellulose	4.50	4.20	4.00	3.50
乙氧基喹啉 ethoxyquin	0.50	0.50	0.50	0.50
雨生红球藻 <i>H. pluvialis</i> ³	0.00	0.30	0.50	1.00
营养水平 nutrients levels				
粗蛋白质 crude protein	42.12	42.55	42.31	42.67
粗脂肪 crude lipid	7.91	8.01	7.95	7.99
水分 moisture	10.51	10.33	10.12	10.05
灰分 ash	9.81	9.55	9.14	9.68
虾青素 astaxanthin	0.00	0.03	0.06	0.11

注: 1. 每千克维生素预混料含有: 维生素A醋酸酯 2 500 000 IU, 胆钙化醇 500 000 IU, α -生育酚 6 700 IU, 抗坏血酸 0.1 g, 硫胺素 10 g, 核黄素 6 g, 盐酸吡哆醇 12 g, 烟酸 40 g, D-泛酸钙 15 g, 生物素 0.25 g, 叶酸 0.4 g, 肌醇 200 g, 氰钴胺素 0.02 g, 甲苯醌 4 g。2. 每千克矿物质预混料含有: FeC₆H₅O₇ 4.57 g, ZnSO₄·7H₂O 9.43 g, MnSO₄·H₂O 4.14 g, CuSO₄·5H₂O 6.61 g, MgSO₄·7H₂O 238.97 g, KH₂PO₄ 233.2 g, NaH₂PO₄ 137.03 g, C₆H₁₀CaO₆·5H₂O 34.09 g, CoCl₂·6H₂O 1.36 g。3. 雨生红球藻购自宁波红龙生物科技有限公司(宁波), 虾青素含量约 0.8%。
Notes: 1. Containing the following per kg of vitamin premix: retinyl acetate 2 500 000 IU, cholecalciferol 500 000 IU, α -tocopherol 6 700 IU, ascorbic acid 0.1 g, thiamine 10 g, riboflavin 6 g, pyridoxine hydrochloride 12 g, nicotinic acid 40 g, D-calcium pantothenate 15 g, biotin 0.25 g, folic acid 0.4 g, inositol 200 g, cyanocobalamin 0.02 g, menadione 4 g。2. Containing the following per kg of mineral premix: FeC₆H₅O₇ 4.57 g, ZnSO₄·7H₂O 9.43 g, MnSO₄·H₂O 4.14 g, CuSO₄·5H₂O 6.61 g, MgSO₄·7H₂O 238.97 g, KH₂PO₄ 233.2 g, NaH₂PO₄ 137.03 g, C₆H₁₀CaO₆·5H₂O 34.09 g, CoCl₂·6H₂O 1.36 g。3. *H. pluvialis* obtained from Ningbo Honglong Biological Technology Co., Ltd (Ningbo), *H. pluvialis* stabilized with 0.8 % astaxanthin

包被反应孔制成固相抗体, 与标记抗体结合后, 形成抗体抗原酶标抗体复合物, 通过底物显色反应, 借助酶标仪测定其吸光度值。

1.4 急性氨氮暴露及取样

养殖实验结束后, 每桶随机挑选 15 尾鱼, 暴露于半致死氨氮浓度 (57.00 mg/L)^[12] 水体中 96 h, 期间停止喂食。预设氨氮浓度通过蠕动泵 (Iwaki 公司, 日本) 滴加入氯化铵溶液 (10 g/L) 进行调整, 蠕动泵于每天早上 8:00~9:00 启动。采用 YSI ProPlus 多参数水质测定仪 (YSI 公司, 美国) 监控水体中氨氮浓度。毒性实验期间, 水温 (29.00±2.00) °C, 溶解氧浓度 (7.05±0.52) mg/L, pH 6.40~

6.60, 亚硝酸盐 <0.50 mg/L, 保持自然光照。

毒性实验结束后, 经 MS-222 麻醉后进行计数, 统计累计死亡率, 每桶随机挑选 3 尾鱼, 用未经肝素浸润过的一次性注射器从尾静脉中抽血, 4 °C 过夜, 离心 (836×g, 10 min, 4 °C) 获得血清, -20 °C 保存, 用于血氨含量测定, 并解剖获取肝脏, -20 °C 保存, 用于氨代谢相关酶含量测定。

1.5 统计分析

实验数据采用 SPSS 18.0.0 软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 结果以平均值±标准误差 (mean ± SE) 表示, 如果组间差异显著 ($P < 0.05$), 则采用 Tukey 检验进行多重比较。

生长性能相关计算公式如下:

成活率 (survival rate, SR, %) = $N_t/N_0 \times 100\%$

增重率 (weight gain rate, WGR, %) = $(W_t - W_0) / W_0 \times 100\%$

饲料系数 (feed conversion ratio, FCR) = $W_t / (W_t - W_0)$

肝体比 (hepatosomatic index, HSI, %) = $W_h / W \times 100\%$

肥满度 (condition factor, CF, g/cm^3) = W/L^3

式中, N_t 为终末尾数, N_0 为初始尾数, W_t 为终末体质量 (g), W_0 为初始体质量 (g), W_t 为摄入饲料量 (g), W_h 为鱼肝脏重 (g), W 为鱼体质量 (g), L 为鱼体长 (cm)。

2 结果

饲料中添加雨生红球藻能够显著提高实验鱼的终末体质量及增重, 显著降低饲料系数 ($P < 0.05$), 但 0.30%~1.00% 雨生红球藻组之间并未检测出显著性差异 ($P > 0.05$)。饲料中添加雨生红球藻并未对实验鱼的肝体比、肥满度及存活率产生显著性影响 ($P > 0.05$) (表 2)。

摄食富含雨生红球藻饲料的鱼体粗脂肪含量显著高于对照组 ($P < 0.05$), 但摄食雨生红球藻含量 0.30%~1.00% 饲料组之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。鱼体粗蛋白质、水分及灰分未受到饲料中雨生红球藻含量的影响 ($P > 0.05$) (表 3)。

表 2 饲料中添加不同水平雨生红球藻对黄颡鱼生长性能和饲料利用的影响

Tab. 2 Growth performance and feed utilization of the yellow catfish fed diets supplemented with various levels of *H. pluvialis*

项目 items	饲料中雨生红球藻添加量/% dietary <i>H. Pluvialis</i> supplemental level			
	0	0.30	0.50	1.00
终末体质量/g FBW	32.27±5.01 ^a	37.63±2.01 ^b	38.68±1.25 ^b	38.48±2.05 ^b
增重率/% WGR	534.00±37.70 ^a	641.20±30.50 ^b	662.00±12.80 ^b	658.20±26.60 ^b
饲料系数 FCR	1.48±0.10 ^b	0.92±0.05 ^a	0.96±0.13 ^a	0.92±0.09 ^a
肝体比/% HSI	1.01±0.05	0.99±0.09	0.95±0.05	0.97±0.08
肥满度/(g/cm ³) CF	1.85±0.36	1.90±0.29	1.89±0.10	1.92±0.21
成活率/% SR	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00

注: 同行数据肩标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同

Notes: In the same line, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$), the same below

饲料中添加雨生红球藻能够显著提高实验鱼的血红蛋白含量, 降低白细胞数 ($P < 0.05$), 但 0.30%~1.00% 雨生红球藻组之间并未检测出显著性差异 ($P > 0.05$)。饲料中添加雨生红球藻并未对红细胞数、血容积、血清总蛋白、白蛋白、球蛋白、葡萄糖、甘油三酯、胆固醇、谷丙转氨酶及谷草转氨酶造成影响 ($P > 0.05$) (表 4)。

饲料中添加 0.50%~1.00% 雨生红球藻组实验鱼血清超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶活

性及丙二醛的含量显著低于 0.30% 雨生红球藻组, 对照组显著最高 ($P < 0.05$); 对照组实验鱼血清过氧化氢酶活性显著高于添加雨生红球藻组 ($P < 0.05$) (表 5)。

饲料中添加雨生红球藻能够显著提高实验鱼的血清溶菌酶活性, 0.50%~1.00% 雨生红球藻添加量显著最高 ($P < 0.05$); 对照组实验鱼血清总补体含量显著低于雨生红球藻组 ($P < 0.05$); 饲料中添加雨生红球藻并未对血清总免疫球蛋白含量造

表 3 饲料中添加不同水平雨生红球藻对黄颡鱼体粗成分的影响

Tab. 3 Whole body composition of the yellow catfish fed diets supplemented with various levels of *H. pluvialis*

项目 items	饲料中雨生红球藻添加量/% dietary <i>H. Pluvialis</i> supplemental level			
	0	0.30	0.50	1.00
水分/% moisture	74.31±0.32	74.98±0.38	74.85±0.88	74.76±0.76
粗蛋白质/% crude protein	3.23±0.62	3.55±0.66	3.46±0.12	3.28±0.08
粗脂肪/% crude lipid	13.85±0.87 ^a	14.25±0.78 ^b	14.12±0.16 ^b	14.33±0.33 ^b
灰分/% ash	11.32±0.98	11.47±0.33	11.35±0.12	11.26±0.45

表 4 饲料中添加不同水平雨生红球藻对黄颡鱼血液学指标的影响

Tab. 4 Hematological parameters of the yellow catfish fed diets supplemented with various levels of *H. pluvialis*

项目 items	饲料中雨生红球藻添加量/% dietary <i>H. pluvialis</i> supplemental level			
	0	0.30	0.50	1.00
红细胞数/($\times 10^9$ /mL) red blood cell count	2.40 \pm 0.08	2.15 \pm 0.12	2.25 \pm 0.15	2.31 \pm 0.11
白细胞数/($\times 10^6$ /mL) white blood cell count	195.22 \pm 15.35 ^b	149.88 \pm 11.44 ^a	106.78 \pm 13.87 ^a	108.12 \pm 10.08 ^a
血红蛋白/(g/100 mL) hemoglobin	49.12 \pm 3.45 ^a	54.55 \pm 6.63 ^b	54.89 \pm 3.98 ^b	55.10 \pm 9.28 ^b
血容积/% hematocrit	33.55 \pm 2.07	33.25 \pm 9.12	33.58 \pm 8.05	33.15 \pm 6.58
总蛋白/(g/L) total proteins	20.46 \pm 3.19	20.58 \pm 2.51	20.12 \pm 3.01	20.33 \pm 4.85
白蛋白/(g/L) albumin	5.16 \pm 0.12	5.47 \pm 0.12	5.25 \pm 0.66	5.67 \pm 0.38
球蛋白/(g/L) globulin	18.89 \pm 3.24	18.58 \pm 1.25	18.97 \pm 6.35	18.79 \pm 4.18
葡萄糖/(mmol/L) glucose	4.84 \pm 0.98	4.52 \pm 0.84	4.12 \pm 0.35	4.65 \pm 0.12
甘油三酯/(mmol/L) triglycerides	2.12 \pm 1.01	2.72 \pm 0.43	2.79 \pm 0.97	2.71 \pm 0.35
胆固醇/(mmol/L) cholesterol	2.28 \pm 0.12	2.29 \pm 0.38	2.23 \pm 0.25	2.21 \pm 0.19
谷丙转氨酶/(U/L) alanine transaminase	13.00 \pm 2.17	13.89 \pm 1.09	13.53 \pm 1.45	13.66 \pm 2.35
谷草转氨酶/(U/L) aspartate transaminase	87.67 \pm 9.85	87.66 \pm 4.98	88.01 \pm 10.25	87.91 \pm 9.89

表 5 饲料中添加不同水平雨生红球藻对黄颡鱼血清抗氧化酶活性的影响

Tab. 5 Serum antioxidant enzymes activity of the yellow catfish fed diets supplemented with various levels of *H. pluvialis*

项目 items	饲料中雨生红球藻添加量/% dietary <i>H. pluvialis</i> supplemental level			
	0	0.30	0.50	1.00
超氧化物歧化酶/(U/mL) superoxide dismutase	252.35 \pm 15.33 ^c	225.18 \pm 11.30 ^b	201.66 \pm 9.89 ^a	203.12 \pm 12.69 ^a
过氧化氢酶/(U/mL) catalase	11.44 \pm 2.15 ^b	8.15 \pm 2.23 ^a	8.03 \pm 1.14 ^a	8.46 \pm 0.98 ^a
谷胱甘肽过氧化物酶/(U/mL) glutathione peroxidase	389.53 \pm 11.01 ^c	375.81 \pm 10.01 ^b	299.98 \pm 19.02 ^a	298.68 \pm 13.33 ^a
丙二醛/(nmol/mL) malondialdehyde	2.89 \pm 0.12 ^c	2.67 \pm 0.16 ^b	2.11 \pm 0.07 ^a	2.05 \pm 0.05 ^a

成影响 ($P>0.05$)(表 6)。

96 h 急性氨氮暴露实验结束后, 0.50%~1.00% 雨生红球藻组实验鱼累积死亡率显著低于 0.30% 雨生红球藻组和对照组 ($P<0.05$), 0.30% 雨生红球藻组与对照组之间无显著性差异 ($P>0.05$); 血氨含量随着饲料中雨生红球藻含量的提高显著降低 ($P<0.05$), 但 0.50% 与 1.00% 雨生红球藻组之间无显著性差异 ($P>0.05$)(表 7)。

肝脏中氨甲酰磷酸合成酶和精氨酸酶含量随饲料中雨生红球藻含量的提高显著提高 ($P<0.05$);

摄食富含雨生红球藻饲料的实验鱼肝脏中谷氨酰胺合成酶和谷氨酸脱氢酶含量显著高于对照组 ($P<0.05$), 但 0.30%~1.00% 雨生红球藻组之间无显著性差异 ($P>0.05$)(表 8)。

3 讨论

研究表明, 饲料中富含虾青素对一些鱼类具有明显的促生长作用, 如: 虹鳟^[13]、大西洋鲑 (*Salmo salar*)^[14] 及欧鲇 (*Silurus glanis*)^[15], 其原因

表 6 饲料中添加不同水平雨生红球藻对黄颡鱼免疫应答的影响

Tab. 6 Serum immunological assays of the yellow catfish fed diets supplemented with various levels of *H. pluvialis*

项目 items	饲料中雨生红球藻添加量/% dietary <i>H. pluvialis</i> supplemental level			
	0	0.30	0.50	1.00
溶菌酶/(U/mL) lysozyme	211.45 \pm 11.38 ^a	225.11 \pm 11.54 ^b	245.74 \pm 10.33 ^c	250.12 \pm 9.87 ^c
总补体/(U/mL) total complement	59.12 \pm 8.33 ^a	67.12 \pm 11.06 ^b	68.54 \pm 9.87 ^b	67.98 \pm 9.95 ^b
总免疫球蛋白/(mg/mL) total immunoglobulin	2.78 \pm 0.11	2.83 \pm 0.25	2.66 \pm 0.12	2.86 \pm 0.45

表 7 氨氮暴露下黄颡鱼的累积死亡率及血氨含量

Tab. 7 Cumulative mortality and content of blood ammonia in yellow catfish exposed to ammonia at hour 96

项目 items	饲料中雨生红球藻添加量/% dietary <i>H. pluvialis</i> supplemental level			
	0	0.30	0.50	1.00
累积死亡率/% cumulative mortality	62.22±3.85 ^b	60.00±6.67 ^b	24.44±3.85 ^a	22.22±7.70 ^a
血氨/($\mu\text{mol/g}$) blood ammonia	152.85±11.78 ^c	145.53±9.79 ^b	129.74±10.66 ^a	130.12±9.85 ^a

表 8 氨氮暴露下黄颡鱼肝脏中氨代谢相关酶含量

Tab. 8 Contents of ammonia metabolism related enzymes in liver of yellow catfish exposed to ammonia at hour 96

项目 items	饲料中雨生红球藻添加量/% dietary <i>H. pluvialis</i> supplemental level			
	0	0.30	0.50	1.00
氨甲酰磷酸合成酶/($\mu\text{g/mg}$) carbamyl phosphate synthetase	311.21±9.12 ^a	450.01±11.22 ^b	512.66±12.69 ^c	553.78±12.01 ^d
精氨酸酶/($\mu\text{g/mg}$) arginase	812.66±9.98 ^a	992.11±25.33 ^b	1025.32±29.85 ^c	1042.66±19.23 ^c
谷氨酰胺合成酶/($\mu\text{g/mg}$) glutamine synthetase	1521.33±35.12 ^a	2621.42±31.12 ^b	2653.45±53.78 ^b	2688.66±51.19 ^b
谷氨酸脱氢酶/($\mu\text{g/mg}$) glutamate dehydrogenase	715.44±11.25 ^a	985.67±7.98 ^b	986.33±11.22 ^b	989.98±21.05 ^b

可能是虾青素的摄入会加速维生素 A 在体内的蓄积, 而维生素 A 对鱼类具有明显的促生长作用^[14]。本研究发现, 饲料中添加雨生红球藻尽管显著提高了黄颡鱼的生长性能, 并降低了饲料系数, 但当雨生红球藻在饲料中的添加量超过 0.30% 时, 其促生长作用不再明显, 类似的现象在大西洋鲑鱼 (*Gadus morhua*)^[16] 和真鲷 (*Pagrus pagrus*)^[17] 中有报道。此外, 雨生红球藻富含脂质, 体脂的积累也可能是导致体质量显著升高的原因之一, 在本研究中, 饲料中添加雨生红球藻显著提高了全鱼体粗脂肪含量。

研究表明, 饲料中富含虾青素可以改善鱼类的血液健康状况^[18], 在本研究中也发现了类似的结果, 摄食富含雨生红球藻饲料的黄颡鱼血液中白细胞数显著降低。此外, 本研究还发现, 与雨生红球藻组相比, 对照组黄颡鱼被检测到较低的血红蛋白含量。血红蛋白含量下降与细胞膜过氧化损伤有关, 过氧化损伤往往会引起细胞膜脂肪酸组成的改变, 继而引起造血组织停止产生血细胞^[19-20]。丙二醛是脂质过氧化产物, 能够与亲核基团的蛋白质、核酸和氨基磷脂发生交联聚合, 它的过度积累会导致细胞毒性, 加速细胞和组织的氧化损伤^[21]。在本研究中, 与雨生红球藻组相比, 对照组黄颡鱼血清丙二醛含量较高。先前的研究发现, 由过氧化损伤引起的抗氧化酶过度激

活, 可通过营养的手段进行调节^[22]。虾青素具有很好的清除自由基的特性, 在含有不饱和脂肪酸的系统中可以充当抗氧化剂的角色^[23]。在本研究中, 随着饲料中雨生红球藻含量的提高, 黄颡鱼血清中超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性呈逐渐降低趋势, 而随之下落的血清丙二醛含量进一步证实, 随着饲料中雨生红球藻含量的提高, 机体氧化损伤得到明显改善。

本研究发现, 饲料中添加不同水平的雨生红球藻会显著影响黄颡鱼的先天免疫应答。溶菌酶是鱼类先天免疫的重要指标之一, 在机体中广泛分布, 是鱼类血清(或黏液)中重要的杀菌剂, 作为一种阳离子酶, 通过攻击细菌细胞壁肽聚糖中 n-乙酰酰胺酸和 n-乙酰氨基葡萄糖胺之间的 β -1,4 糖苷键, 能够分解革兰氏阳性菌, 并与补体甚至一些革兰氏阴性菌相结合^[23-24]。在哺乳类研究中发现, 饲料中添加虾青素能够显著提高溶菌酶活性^[25]。在本研究中, 血清溶菌酶活性随着饲料中雨生红球藻水平的升高显著提高, 同时也发现了补体含量的显著提高。补体在鱼类的先天免疫应答中起到十分重要的作用, 在鱼类的血清(或黏液)中起到杀菌作用, 还可以通过与吞噬细胞表面的特定结合位点相结合, 作为调理素促进吞噬作用^[26]。补体易受到温度的影响, 尽管已有研究并没有发现虾青素能够对鱼类的补体造成显著影响,

但在恒温环境中, 虾青素的摄入对补体的影响尚无定论^[25]。本研究还发现, 雨生红球藻的摄入并未对黄颡鱼血清总免疫球蛋白含量造成影响。在哺乳动物中已证实, T 细胞依赖抗原在接受炎症刺激信号时, 可引起强烈的炎症反应, 此时, T 细胞依赖抗原诱导促炎 T 细胞和 B 细胞反应, 产生免疫球蛋白^[27]。尽管胡萝卜素能够增强鱼类 B 细胞和 T 细胞的增殖, 但尚无证据表明类胡萝卜素(虾青素是一种类胡萝卜素)可以增加鱼类免疫球蛋白的产生, 因为鱼类缺乏类别转换基因序列, 只有免疫球蛋白 M 一种基因型^[28]。

摄食生长实验结束后, 所有处理组的黄颡鱼被暴露到半致死浓度的氨氮水体中 96 h 后, 发现饲料中雨生红球藻的添加量超过 0.50%, 能够显著降低氨氮暴露下黄颡鱼的血氨含量及累积死亡率。结果提示, 饲料中添加雨生红球藻能够降低氨氮暴露下黄颡鱼的死亡率。在长期自然选择和进化下, 大多数鱼类能够适应环境中一定范围的氨氮浓度波动, 这得益于鱼类自身的氨氮解毒生理调控策略, 已知的氨去除途径主要包括: 在氨甲酰磷酸合成酶作用下, 氨进入尿素循环; 氨在谷氨酰胺合成酶催化下生成谷氨酰胺; 通过鳃逆浓度梯度向环境中排氨, 或通过皮肤向环境中挥发氨; 降低蛋白质的分解代谢减少氨的产生; 依赖特异性的离子通道, 忍受体内高氨积累^[29]。先前的研究已证实, 黄颡鱼氨氮解毒主要依赖于尿素循环途径和谷氨酰胺合成途径^[12]。本研究发现, 尿素循环途径的关键酶(氨甲酰磷酸合成酶和精氨酸酶)的含量随着饲料中雨生红球藻含量的提高显著增多, 而谷氨酰胺合成途径关键酶(谷氨酰胺合成酶和谷氨酸脱氢酶)的含量虽然也受到了饲料中雨生红球藻的影响, 但并没有明显的剂量依赖效应。据此推测, 雨生红球藻在黄颡鱼氨氮解毒过程中发挥作用的靶点很可能是尿素循环途径, 相比谷氨酰胺合成来说, 尿素循环在黄颡鱼氨氮解毒过程中的地位更为重要。

综上, 饲料中添加雨生红球藻能够显著提高黄颡鱼的生长性能、降低饲料系数、改善血液健康状况、氧化损伤及免疫应答能力; 饲料中雨生红球藻的添加量超过 0.50% 能够显著提高黄颡鱼在氨氮暴露下的存活率。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Niu J, Wen H, Li C H, *et al.* Comparison effect of dietary astaxanthin and β -carotene in the presence and absence of cholesterol supplementation on growth performance, antioxidant capacity and gene expression of *Penaeus monodon* under normoxia and hypoxia condition[J]. *Aquaculture*, 2014, 422-423: 8-17.
- [2] Liu F, Shi H Z, Guo Q S, *et al.* Effects of astaxanthin and emodin on the growth, stress resistance and disease resistance of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 51: 125-135.
- [3] Sheikhzadeh N, Tayefi-Nasrabadi H, Oushani A K, *et al.* Effects of *Haematococcus pluvialis* supplementation on antioxidant system and metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2012, 38(2): 413-419.
- [4] Lorenz R T, Cysewski G R. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin[J]. *Trends in Biotechnology*, 2000, 18(4): 160-167.
- [5] Sarada R, Bhattacharya S, Ravishankar G A. Optimization of culture conditions for growth of the green alga *Haematococcus pluvialis*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2002, 18(6): 517-521.
- [6] Steinbrenner J, Linden H. Light induction of carotenoid biosynthesis genes in the green alga *Haematococcus pluvialis*: regulation by photosynthetic redox control[J]. *Plant Molecular Biology*, 2003, 52(2): 343-356.
- [7] Milan F S, Maleki B R S, Moosavy M H, *et al.* Ameliorating effects of dietary *Haematococcus pluvialis* on arsenic-induced oxidative stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillet[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 207: 111559.
- [8] 张丽婧, 刘臻, 刘冬英, 等. 水溶性雨生红球藻虾青素粉对小鼠抗疲劳功能研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(10): 3100-3104.
Zhang L J, Liu Z, Liu D Y, *et al.* Study on the anti-fatigue function of water soluble astaxanthin powder from *Haematococcus pluvialis* in mice[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2020, 11(10): 3100-3104 (in Chinese).
- [9] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴-2020[M]. 北京: 中国农业出版社, 2020: 25.
Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, National Fisheries Technology

- Extension Center, China Society of Fisheries. China Fishery Statistical Yearbook-2020[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2020: 25 (in Chinese).
- [10] Howitz W. Official Methods of Analysis of AOAC International[M]. 17th ed. Arlington: AOAC International, 2000: 16.
- [11] Li M, Chen L Q, Qin J G, *et al.* Growth performance, antioxidant status and immune response in darkbarbel catfish *Pelteobagrus vachelli* fed different PUFA/vitamin E dietary levels and exposed to high or low ammonia[J]. *Aquaculture*, 2013, 406-407: 18-27.
- [12] Li M, Zhang M Z, Qian Y X, *et al.* Ammonia toxicity in the yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*): the mechanistic insight from physiological detoxification to poisoning[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 102: 195-202.
- [13] Page G I, Davies S J. Tissue astaxanthin and canthaxanthin distribution in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2006, 143(1): 125-132.
- [14] Christiansen R, Torrissen O J. Growth and survival of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. fed different dietary levels of astaxanthin. Juveniles[J]. *Aquaculture Nutrition*, 1996, 2(1): 55-62.
- [15] Zařková I, Sergejevová M, Urban J, *et al.* Carotenoid-enriched microalgal biomass as feed supplement for freshwater ornamentals: albinic form of wels catfish (*Silurus glanis*)[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2011, 17(3): 278-286.
- [16] Sawanboonchun J, Roy W J, Robertson D A, *et al.* The impact of dietary supplementation with astaxanthin on egg quality in Atlantic cod broodstock (*Gadus morhua*, L.)[J]. *Aquaculture*, 2008, 283(1-4): 97-101.
- [17] Tejera N, Cejas J R, Rodríguez C, *et al.* Pigmentation, carotenoids, lipid peroxides and lipid composition of skin of red porgy (*Pagrus pagrus*) fed diets supplemented with different astaxanthin sources[J]. *Aquaculture*, 2007, 270(1-4): 218-230.
- [18] Řehulka J. Influence of astaxanthin on growth rate, condition, and some blood indices of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Aquaculture*, 2000, 190(1-2): 27-47.
- [19] Chen R G, Lochmann R, Goodwin A, *et al.* Effects of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentrations and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*)[J]. *Aquaculture*, 2004, 242(1-4): 553-569.
- [20] Puangkaew J, Kiron V, Satoh S, *et al.* Antioxidant defense of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to dietary n-3 highly unsaturated fatty acids and vitamin E contents[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2005, 140(2): 187-196.
- [21] Ernster L, Nor De Nbrand K, Orrenius S, *et al.* Microsomal lipid peroxidation[J]. *Methods Enzymol*, 1977, 52(11): 302-310.
- [22] Trenzado C E, Morales A E, Palma J M, *et al.* Blood antioxidant defenses and hematological adjustments in crowded/uncrowded rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed on diets with different levels of antioxidant vitamins and HUFA[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2009, 149(3): 440-447.
- [23] Young A J, Lowe G M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids[J]. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 2001, 385(1): 20-27.
- [24] Alexander J B, Ingram G A. Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish[J]. *Annual Review of Fish Diseases*, 1992, 2: 249-279.
- [25] Saurabh S, Sahoo P K. Lysozyme: An important defence molecule of fish innate immune system[J]. *Aquaculture Research*, 2008, 39(3): 223-239.
- [26] Park J S, Mathison B D, Hayek M G, *et al.* Astaxanthin stimulates cell-mediated and humoral immune responses in cats[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2011, 144(3-4): 455-461.
- [27] Chew B P, Mathison B D, Hayek M G, *et al.* Dietary astaxanthin enhances immune response in dogs[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2011, 140(3-4): 199-206.
- [28] Thompson I, Choubert G, Houlihan D F, *et al.* The effect of dietary vitamin A and astaxanthin on the immunocompetence of rainbow trout[J]. *Aquaculture*, 1995, 133(2): 91-102.
- [29] Chen Q M, Zhao H X, Huang Y H, *et al.* Effects of dietary arginine levels on growth performance, body composition, serum biochemical indices and resistance ability against ammonia-nitrogen stress in juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. *Animal Nutrition*, 2016, 2(3): 204-210.

Effects of dietary *Haematococcus pluvialis* on growth, antioxidant enzyme activity, immune response and ammonia tolerance in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*

FAN Yuwen¹, ZHANG Muzi², LI Ming^{1*}, QIAN Yunxia¹, WANG Rixin¹, JIANG Haibo^{2*}

(1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: In order to explore effects of dietary *Haematococcus pluvialis* on growth, antioxidant enzyme activity, immune response and ammonia tolerance in yellow catfish. Yellow catfish (5.00±0.85) g was selected as the study object. The four diets were formulated to contain four graded dietary *H. pluvialis* levels: 0.00% (control), 0.30%, 0.50% and 1.00%. Each diet was randomly assigned to triplicate groups of 30 fish twice daily to apparent satiation. The experiment lasted for 10 weeks. The results indicated that fish fed the diet containing *H. pluvialis* more than 0.30% showed the highest weight gain rate and hemoglobin content, and the lowest feed conversion ratio and white blood cell count. Serum superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities and malondialdehyde content of fish fed 0.50% *H. pluvialis* diet were lower than those of fish fed other diets, but serum lysozyme activity was higher. Cumulative mortality and blood ammonia level in fish fed 0.50%~1.00% *H. pluvialis* were lower than those of fish in control group after being exposed to ammonia for 96 hours. Dietary supplementation of *H. pluvialis* significantly increased the contents of ammonia metabolism enzymes in liver of fish exposed to ammonia, and the contents of carbamyl phosphate synthase and arginase were significantly increased with the increase of the *H. pluvialis* levels. The results showed that dietary supplementation of more than 0.30% *H. pluvialis* could significantly improve the growth, blood health status, oxidative damage and immune response of yellow catfish. The survival rate of yellow catfish exposed to ammonia can be significantly improved by adding more than 0.50% of *H. pluvialis* in the diet.

Key words: *Pelteobagrus fulvidraco*; *Haematococcus pluvialis*; astaxanthin; stress resistance; ammonia

Corresponding authors: LI Ming. E-mail: liming1@nbu.edu.cn; JIANG Haibo. E-mail: jhb99412@126.com

Funding projects: The National Natural Science Foundation of China (32072948); The Fundamental Research Funds for the Provincial Universities of Zhejiang (SJLY2020009); The Key Research and Development Program of Zhejiang Province (2019C02049); The Natural Science Foundation of Ningbo City (202003N412); The Natural Science Research Fund (Special-post) of Guizhou University (2021(26)); The Natural Science Foundation of Guizhou Province of China (20191114); The Open Project of Key Lab of Freshwater Biodiversity Conservation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of China (LFBC1010)