

黑鲷对 Fe, Zn, Cu, Co 和 I 的营养需求*

王辉亮 李荷芳 梁德海 樊云真 刘发义

(中国科学院海洋研究所)

作者在本刊的前一篇文章中报告了黑鲷对 Ca, P, K, Mg 和 Mn 的营养需求, 本文将报告黑鲷对 Fe, Cu, Zn, Co 和 I 的营养需求的研究结果。

一、材料和方法

1. 实验动物 实验用黑鲷于 1994 年 9 月上旬购自青岛石老人育苗厂, 体重 30g 左右, 运回实验室后, 暂养于水族箱中, 投喂人工配合饲料进行摄食驯化, 3 天后进行养殖实验。

2. 实验设计 本实验采取正交设计。在以干酪素、明胶、糊精、鱼油、豆油、维生素预混料和不含 Fe, Cu, Zn, Co 和 I 的矿物质预混料组成的半纯化饲料中, 添加不同含量

表 1 各种饲料中 5 种元素的含量 (mg/kg)*

饲料号	Fe	Zn	Cu	Co	I
1	89.40	50.22	0	0	0
2	89.40	70.22	2.50	2.50	0.60
3	89.40	90.22	5.00	5.00	1.20
4	89.40	130.22	10.00	10.00	2.40
5	164.40	50.22	2.50	5.00	2.40
6	164.40	70.22	0	10.00	1.20
7	164.40	90.22	10.00	0	0.60
8	164.40	130.22	5.00	2.50	0
9	239.40	50.22	5.00	10.00	0.60
10	239.40	70.22	10.00	5.00	0
11	239.40	90.22	0	2.50	2.40
12	239.40	130.22	2.50	0	1.20
13	389.40	50.22	10.00	2.50	1.20
14	389.40	70.22	5.00	0	2.40
15	389.40	90.22	2.50	10.00	0
16	389.40	130.22	0	5.00	0.60

* Fe, Zn, Cu, Co 和 I 分别以 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 KI 的形式加入到饲料中。

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 2376 号。

收稿日期: 1995 年 3 月 24 日。

的 Fe, Cu, Zn, Co 和 I, 每种元素取 4 个水平, 按照 $L_{16}(4^5)$ 正交表要求, 制成 16 种试验饲料。其基础饲料的组成见前文, 各种饲料中 Fe, Cu, Zn, Co 和 I 的含量见表 1。

3. 饲料加工 称取所需的 Fe, Zn, Cu, Co 和 I 的化合物, 研碎混匀, 加入需要量的纤维素为载体, 然后与基础饲料充分混匀, 再加入用热水溶胀的明胶, 混匀后用绞肉机挤压成直径为 3mm 的颗粒, 晾至半干, 放塑料袋中置于冰箱内备用。

4. 养殖试验 将暂养后的黑鲷随机分组, 逐一称重, 放入 32 个长方形玻璃钢水族箱中(每个有效水体 300 L), 每箱放 8 尾鱼, 分成 16 组, 每组两平行, 分别投喂 16 种不同饲料。饲养过程中连续通气, 每天早上清除残饵和排泄物, 换水 1/3 至 1/2。日投饵两次(9:30 和 17:00 各一次), 每次投饵至鱼不主动摄食为止。每天测量水温, 定期测定海水盐度和 pH 值。试验期间 pH 为 7.9—8.0, 盐度为 32 左右, 水温 15—24.5℃。试验结束时, 对各箱鱼进行称重, 计算出平均增重率、成活率和饲料系数。

5. 饲料和鱼体内元素含量的测定 试验结束后, 每组取 5 尾鱼, 取其肝脏, 湿法消化, 用 P-E373 或 P-E4100ZL 型原子吸收分光光度计测定其中的 Fe, Cu, Zn 和 Co 的含量, 用同样的方法测定基础饲料中上述几种元素的含量。由于设备的限制, I 的含量未能测定。

6. 细胞色素氧化酶活性的测定 取 0.5 g 左右的肝脏样品, 加入 5 ml (浓度为 0.2 mol/L) $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{--KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液 (pH 为 7.4), 在冰浴中用玻璃匀浆器匀浆, 高速冷冻离心机 (Tomy seiko co LTD) 于 4℃ 条件下先用 3000r/min 离心 10min, 上清液再用 11800r/min 离心 20min, 取后者的沉淀部分重新悬浮于磷酸缓冲液中, 即得粗酶液。然后按 Smith (1954) 的方法测定其细胞色素氧化酶的活性, 同时用双缩脲法测定其蛋白质含量(北京大学生物系生物化学教研室, 1979), 求出比活性。

7. 羧肽酶 A 活性的测定 取 0.7g 左右的肝脏样品, 称重后加入适量经冰浴冷却过的蒸馏水, 用玻璃匀浆器匀浆, 在 0℃ 条件下, 12680r/min 离心 20min, 上清液即为粗酶液, 然后按 Sakamoto and Yone (1978) 的方法测定其酶活性, 用上述方法测定酶液中蛋白质含量, 求得羧肽酶 A 的比活性。

二、结 果

1. 黑鲷的生长情况 试验结束时各组鱼的成活率、增重率和饲料系数列于表 2。第一号饲料的鱼在实验进行到第 20 天时发生意外, 突然全部死亡, 表中该组鱼的增重率是根据正交试验中对丢失数据补偿的方法求得的。对养殖试验前后各组鱼体重均值进行的方差分析发现, 试验前各组鱼体重无显著差异, 而试验结束时各组鱼的体重均值存在显著差异, 说明各组饲料饲养的黑鲷的增重率存在显著差异。

实验结束时黑鲷增重率的直观分析表明(表 3), Fe, Zn, Cu, Co 和 I 分别取第四、第三、第二、第一和第三水平, 即 Fe, Zn, Cu 和 I 在饲料中的含量分别为 389.40mg/kg, 90.22mg/kg, 2.50mg/kg 和 1.20mg/kg, 而 Co 不添加时, 其增重效果最好。但是方差分析表明, 只有 Cu 含量的变化对增重率的影响有显著性。

2. 肝脏细胞色素氧化酶和羧肽酶 A 的活性 表 4 和表 5 是肝脏中这两种酶活性

表 2 养殖试验结果

饲料编号	成活率 (%)			增重率 (%)			饲料系数
	1号缸	2号缸	平均值	1号缸	2号缸	平均值	
1	—	—	—	28.06*	44.95*	36.50*	—
2	100	100	100	27.74	35.85	31.80	3.15
3	100	87.5	93.8	30.06	29.76	29.91	4.73
4	87.5	100	93.8	28.54	22.77	25.66	3.46
5	100	100	100	30.31	28.02	29.17	3.35
6	100	100	100	33.60	36.65	35.13	2.95
7	100	100	100	25.85	35.84	30.85	3.52
8	100	100	100	28.02	24.95	26.49	3.17
9	100	100	100	22.39	29.90	26.15	4.21
10	100	100	100	18.81	17.71	18.26	4.85
11	100	100	100	26.06	26.06	26.06	3.58
12	100	100	100	36.41	41.99	39.20	2.79
13	100	100	100	34.30	26.97	30.64	2.67
14	100	100	100	32.27	29.05	30.66	2.61
15	100	100	100	30.02	49.18	39.60	3.16
16	100	100	100	27.76	39.70	33.73	3.86

* 为补偿值

表 3 实验结束时黑鲟增重率的直观分析

饵料号	Fe	Zn	Cu	Co	I	增重率 (%)		
						1号箱	2号箱	合计
1	1	1	1	1	1	28.06	44.95	73.01
2	1	2	2	2	2	27.74	35.85	63.59
3	1	3	3	3	3	30.06	29.76	59.81
4	1	4	4	4	4	28.54	22.77	51.31
5	2	1	2	3	4	30.31	28.02	58.33
6	2	2	1	4	3	33.60	36.65	70.29
7	2	3	4	1	2	25.85	35.84	61.69
8	2	4	3	2	1	28.02	24.95	52.97
9	3	1	3	4	2	22.39	29.90	52.29
10	3	2	4	3	1	18.81	17.71	36.52
11	3	3	1	2	4	26.06	26.06	52.12
12	3	4	2	1	3	36.41	41.99	78.40
13	4	1	4	2	3	34.30	26.97	61.27
14	4	2	3	1	4	32.27	29.05	61.32
15	4	3	2	4	1	30.02	49.18	79.20
16	4	4	1	3	2	27.76	39.70	67.46
各水平和								
1	247.72	244.90	262.88	274.42	241.70			
2	243.28	231.72	279.52	229.95	245.03			
3	219.33	252.82	226.39	222.12	269.77			
4	269.25	250.14	210.79	253.09	223.00			
极差	49.92	21.13	69.16	52.30	46.69			
优水平	4	3	2	1	3			
主次顺序	Cu(2)>Co(1)>Fe(4)>I(3)>Zn(3)							

的测定结果及其直观分析。

从表 4 可看出, 饲料中 Cu 浓度的改变对肝脏细胞色素氧化酶的活性影响最大, 方差分析表明其影响具有显著性 ($P < 0.05$), 且酶活性随着饲料和肝脏中 Cu 浓度的增加而增加; 饲料中 Fe, Co 和 I 含量变化对该酶的活性没有显著影响。回归分析表明, 该酶的活性与饲料中和肝脏中 Cu 的浓度都呈非常显著的线性相关关系 ($P < 0.01$), 饲料中 Zn 含量的变化对该酶活性的影响虽然不显著, 但两者之间也存在着显著的线性相关关系 ($P < 0.05$)。

对肝脏羧肽酶 A 活性影响最大的是 Co, 其次是 Zn, 再次是 Fe。方差分析表明, Co 的影响具有显著性 ($P < 0.05$), 随着饲料中 Co 浓度的增加, 酶活性上升, 两者呈非常显著的线性相关关系 ($P < 0.01$); Zn 对该酶活性的影响也有一定的显著性 ($P < 0.1$)。饲料中其它几种元素含量的变化对羧肽酶 A 活性的影响则不显著。

表 4 黑鲷肝脏中细胞色素氧化酶活性及其直观分析

试 验 号	Fe	Zn	Cu	Co	I	酶活性 (U/mg) ¹⁾
1	1	1	1	1	1	10.06 ²⁾
2	1	2	2	2	2	22.13
3	1	3	3	3	3	52.63
4	1	4	4	4	4	62.31
5	2	1	2	3	4	15.02
6	2	2	1	4	3	14.77
7	2	3	4	1	2	42.43
8	2	4	3	2	1	39.48
9	3	1	3	4	2	26.09
10	3	2	4	3	1	43.06
11	3	3	1	2	4	14.39
12	3	4	2	1	3	42.89
13	4	1	4	2	3	29.25
14	4	2	3	1	4	29.71
15	4	3	2	4	1	33.51
16	4	4	1	3	2	26.71
各水平和						
1	147.13	80.42	65.93	125.09	126.11	
2	111.70	109.67	113.55	105.25	117.36	
3	126.43	142.96	147.91	137.42	140.00	
4	119.18	171.39	177.05	136.68	121.43	
极 差	35.43	90.97	111.12	31.43	22.64	
优 水 平	1	4	4	3	3	
主次顺序	Cu(4) > Zn(4) > Fe(1) > Co(3) > I(3)					

1) 酶活性单位 U 以 $\lg \Delta A_{550nm} = 0.01/\text{min}$ 表示。

2) 为补偿值。

3. 黑鲷肝脏中几种元素的含量 实验结束时测定了各组鱼肝脏中的 Fe, Zn, Cu 和 Co 的含量, 结果示于表 6。测定结果分析表明, 饲料中 Fe 含量的变化对肝脏中 Fe 含量的影响不显著; 肝脏中 Zn 的浓度随饲料中 Zn 含量的增加而上升, 两者之间有非常显著的

表5 黑鲷肝脏中羧肽酶 A 活性的测定结果及其直观分析

试验号	Fe	Zn	Cu	Co	I	酶活性 (U/mg)
1	1	1	1	1	1	26*
2	1	2	2	2	2	33
3	1	3	3	3	3	70
4	1	4	4	4	4	110
5	2	1	2	3	4	41
6	2	2	1	4	3	88
7	2	3	4	1	2	44
8	2	4	3	2	1	78
9	3	1	3	4	2	106
10	3	2	4	3	1	40
11	3	3	1	2	4	54
12	3	4	2	1	3	52
13	4	1	4	2	3	100
14	4	2	3	1	4	25
15	4	3	2	4	1	112
16	4	4	1	3	2	114
各水平和						
1	239	273	282	147	256	
2	251	186	238	265	297	
3	252	280	279	265	310	
4	351	354	294	416	230	
极差	112	168	56	269	80	
优水平	4	4	4	4	3	
主次顺序	Co(4)>Zn(4)>Fe(4)>I(3)>Cu(4)					

* 为补偿值

相关关系($P < 0.01$);肝脏中Cu的浓度不仅随着饲料中Cu含量的增加而升高($P < 0.05$),而且与饲料中Fe的含量有关,两者呈负的线性相关关系, ($P < 0.05$);肝脏中的Co的浓度与饲料中Co的含量没有明显的相关关系,但与饲料中的Zn呈负相关($P < 0.05$)。由于条件的限制,未能测定肝脏中I的含量。

从上述增重率的直观分析和方差分析的结果可以看出,饲料中Cu含量的变化对黑鲷的增重率影响显著,第二水平(即Cu含量为2.50mg/kg时)增重率最高,但肝脏中细胞色素氧化酶的活性随着饲料中Cu含量的增加一直呈上升的趋势,据此,我们认为黑鲷对Cu的需要量为2.50—10mg/kg,或更高一些。饲料中添加Zn, Co和Fe对黑鲷的增重影响不显著,因此可以认为基础饲料中的Zn和Fe的含量(分别为50.22mg/kg和89.40mg/kg)已可以满足黑鲷的营养需求,而饲料中即使基本不含Co也不影响黑鲷的增重。考虑到添加Zn和Co会提高肝脏羧肽酶A的活性,可以提高鱼对蛋白质的消化率,且较高的Zn还可以提高细胞色素氧化酶的活性,我们认为黑鲷饲料中Zn和Co的合适含量分别为130mg/kg和10mg/kg。由于饲料中添加Fe会降低黑鲷肝脏中Cu的含量,并且有可能降低细胞色素氧化酶的活性,因此推荐饲料中Fe的较合适含量为89mg/kg左右。添加I对黑鲷的增重影响也不显著,但根据直观分析,饲料中I的添加量为1.2mg/kg时

表 6 黑鲷肝脏中 Fe, Zn, Cu 和 Co 的含量 (mg/kg)

饲料号	Fe	Zn	Cu	Co
1*	—	—	—	—
2	42.60	39.17	2.71	0.115
3	40.11	49.30	7.94	0.147
4	51.91	45.16	13.22	0.050
5	61.45	34.52	4.76	0.225
6	52.76	43.88	2.76	0.596
7	48.96	47.68	10.85	0.082
8	63.37	45.71	10.25	0.146
9	62.89	38.40	4.38	0.420
10	66.82	33.65	11.40	0.222
11	43.59	40.30	1.84	0.146
12	45.23	45.41	3.42	0.091
13	49.23	44.10	3.27	0.815
14	52.68	42.15	0.77	0.158
15	30.80	43.87	1.87	0.263
16	36.72	50.86	0.86	0.176

* 由于 1 号饲料饲喂的鱼中途意外全部死亡,故未能获得该组鱼肝脏中几种元素的含量。

增重率最好,因此我们推荐该含量为黑鲷饲料中 I 的较适宜含量。

三、讨 论

关于鱼类对微量元素的营养需求,淡水鱼的研究比较多,海水鱼类则相当少 (Davis and Gatlin et al., 1991), 目前我们只看到 Sakamoto and yone (1978a, 1978b) 报告的真鲷 (*Chrysophrys major*) 对矿物质营养需求的研究结果,他们认为,只要饲料中 Zn, Cu, Co 和 I 的含量分别超过 24.3 mg/kg, 5.1 mg/kg, 4.3 mg/kg 和 0.11 mg/kg, 就可以了,真鲷对 Fe 的需要量为 150 mg/kg。我们的研究表明,对黑鲷增重有显著影响的只有 Cu, 得出的需要量为 2.50—10.00 mg/kg; 饲料中添加和不添加 Zn, Co 和 I, 对黑鲷增重的影响都没有显著性,这与上述真鲷的研究结果类似,但我们根据相对增重率和酶活性变化,认为在黑鲷饲料中应添加适量的 Zn, Co 和 I。

在水生动物微量元素营养的研究中,仅凭增重率等常规的指标来判断其营养需求往往难于得出显著的差异性和明确的结论,借助酶活性等生化指标作为辅助手段则有助于对实验结果作出判断,因为这些生化指标往往比常规的指标更敏感,有时可能更可靠。在本研究中,我们除了根据鱼的增重率、成活率、饲料系数等常规指标来确定其对各种矿物质的需求外,还根据细胞色素氧化酶和羧肽酶 A 等酶活性的变化来确定黑鲷对某些微量元素的需求。Cu 是细胞色素氧化酶的组成成分,有研究表明,该酶可以作为动物体内 Cu 营养状态的很好指标 (Gatlin III and Wilson, 1986)。我们在中国对虾对 Cu 的营养需求的研究中就利用细胞色素氧化酶的活性作为指标之一,判断对虾对 Cu 的需要量 (刘发义等, 1990)。在本实验中,我们也利用了该酶的活性作为确定黑鲷对 Cu 的营养需求的指标之一。羧肽酶 A 是一种含锌酶,其作用是水解某些蛋白质和多肽羧基末端的肽

键,使蛋白质或多肽水解为氨基酸而被生物吸收利用,因此此种酶活性的提高可促进生物对蛋白质的吸收和利用效率。锌是羧肽酶 A 的组成成分, Zn 含量合适会增加该酶的活性,另外有资料表明, Co(II) 能代替其中的 Zn(II), 并使其活性大约增加一倍 (Bertini and Luchinat, 1984)。我们在对虾的矿物质营养研究中,曾用羧肽酶 A 的活性作为判断对虾 Co 营养状况的辅助指标(梁德海等,1991)。在本研究中,我们也用此来作为判断黑鲷对 Zn 和 Co 的营养需求的辅助指标。

微量元素在生物体内有的有协同作用,有的则有拮抗作用。本实验研究中发现, Cu, Fe, Zn 和 Co 之间存在着拮抗作用。饲料中 Fe 含量升高会使肝脏中 Cu 浓度降低,而 Zn 含量升高则会导致肝脏中 Co 的浓度下降,因此过高的 Fe 或 Zn 都有可能影响黑鲷的生长和代谢,对此在设计配方时应予以注意。

参 考 文 献

- 北京大学生物系生物化学教研室, 1979, 生物化学实验指导, 人民教育出版社, 61—62。
- 刘发义、梁德海、孙凤、李荷芳、兰信, 1990, 饲料中的铜对中国对虾的影响, 海洋与湖沼, 21(5): 404—410。
- 李荷芳、王辉亮、梁德海、樊云真、刘发义, 1995, 黑鲷对 Ca, P, K, Mg 和 Mn 的营养需求, 海洋科学集刊, 37: (本刊)。
- 梁德海、刘发义、孙凤、李荷芳、兰信, 1991, 中国对虾对 Co 需要量的研究, 海洋科学, 3: 12—14。
- Bertini, I. and C. Luchinat, 1984, High spin cobalt (II) as a probe for the investigation of metallo-proteins, In: Advances in inorganic biochemistry 6, ed. by G. L. Eichhorn and L. C. Marzilli, ELSEVIER, New York, 94.
- Devillez, E. J., 1965, Isolation of the preteolytic digestive enzymes from the gastric juice of the crayfish *Orconectes virilis* (Hager), *Comp. Biochem. Physiol.* 14: 577—586.
- Davis, A. D. and D. M. Gatlin III, 1991, Dietary mineral requirements of fish and shrimp. In: Proceedings of the Aquaculture feed processing and nutrition workshop, eds. by Akiyama, D. and Tan, R. K. H. American Soybean Association, 49—67.
- Gatlin III, D. M. and R. P. Wilson, 1986, Dietary copper requirement of fingerling channel catfish. *Aquaculture*, 54:277—285.
- Sakamoto, S. and Y. Yone, 1978a, Requirement of red sea bream for dietary iron, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 44(3):221—225.
- Sakamoto, S. and Y. Yone, 1978b, Requirement of red sea bream for dietary trace elements, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 44(22):1341—1344.
- Smith, L., 1954, Methods in Enzymology, volume LIII, ed. by Fleischer, S. and L. Packer. Academic Press, New York, 45—47.

REQUIREMENTS OF *SPARUS MACROCEPHALUS* FOR Fe, Zn, Cu, Co AND I*

Wang Huiliang, Li Hefang, Liang Dehai, Fan Yunzhen and Liu Fayi
(*Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences*)

ABSTRACT

The requirements of black sea bream, *Sparus macrocephalus*, for iron, zinc, copper, cobalt and iodine were studied using semi-purified diets and orthogonal design. Based on the weight gains, mineral contents and the activities of cytochrome oxidase and carboxypeptidase in the fish liver, it is recommended that proper contents of copper, zinc, iron, cobalt and iodine in the diet are 2.50—10.00 mg/kg, 130 mg/kg, 89.40 mg/kg, 10 mg/kg and 1.2 mg/kg, respectively.

* Contribution No. 2376 from Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences.