

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.19298

养殖密度对池塘工程化循环水养殖大口黑鲈抗氧化力、组织结构及应激基因表达的影响

倪金金¹, 王裕玉², 徐钢春^{1,2}, 聂志娟², 李全杰², 徐跑^{1,2}

1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081

摘要: 为研究池塘工程化循环水养殖模式下养殖密度对大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)抗氧化状态、消化酶、组织结构及 *HSP70*、*Cu/Zn-SOD* 应激基因表达的影响, 以初始体重(4.50 ± 0.23) g 的大口黑鲈幼鱼为研究对象, 设置 3 个养殖密度组, 分别为 0.2 kg/m^3 (SD1)、 0.4 kg/m^3 (SD2) 和 0.6 kg/m^3 (SD3), 每个密度组设 3 个重复, 实验周期为 120 d, 分别在实验的第 30 天、60 天、90 天和 120 天采集样本并分析。结果显示, 实验结束时的最终密度分别为 5.64 kg/m^3 (SD1)、 8.79 kg/m^3 (SD2) 和 11.21 kg/m^3 (SD3)。养殖前 90 d, 肝脏超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活力在各密度组间差异不显著($P > 0.05$), 而在 120 d 时 SD1 组显著高于 SD3 组($P < 0.05$); 30 d 和 60 d 时肝脏丙二醛(MDA)含量未受到养殖密度的影响($P > 0.05$), 而 90~120 d 时, SD1 组显著低于 SD3 组($P < 0.05$); 各密度组间肠道淀粉酶、脂肪酶活力没有显著差异($P > 0.05$); 各密度组肝脏 *HSP70*、*Cu/Zn-SOD* mRNA 相对表达水平在 30 d 和 60 d 没有显著差异($P > 0.05$), 90 d 和 120 d 时 SD3 组肝脏 *HSP70* 表达量显著高于 SD1 与 SD2 组($P < 0.05$), SD1 组肝脏 *Cu/Zn-SOD* mRNA 表达量显著高于 SD3 组($P < 0.05$); 切片结果显示, 3 个密度组实验鱼肝脏和肠道结构正常, 未受到严重损害, SD3 组实验鱼肝脏细胞间空泡稍增多, 肠道杯状细胞变小, 数量减少。综上所述, 在本实验条件下, 养殖后期, 养殖密度会对加州鲈生理状态产生影响, 高密度应激会导致鱼体抗氧化以及免疫功能受到抑制, 肝脏、肠道组织产生轻微损伤, 0.2 kg/m^3 密度组大口黑鲈的生理状况最好。综合考虑, 池塘工程化循环水养殖模式下大口黑鲈幼鱼的放养密度以 $0.2 \sim 0.4 \text{ kg/m}^3$ 为宜。

关键词: 大口黑鲈; 养殖密度; 池塘工程化循环水养殖; 抗氧化; 组织结构; *HSP70*; *Cu/Zn-SOD*

中图分类号: S965

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)06-0660-11

池塘工程化循环水养殖(in-pond raceway system, IPRS)于 20 世纪 90 年代末由美国奥本大学开发^[1]。引入中国后, 科研工作者对该养殖模式进行了改造, 利用 2%~5% 的池塘水面建成具有气提推水增氧和集排污装备的系列水槽作为养殖区, 其余 95%~98% 的水面作为净化区, 实现养殖周期内养殖用水的循环利用^[2], 实现了绿色环保、肉质鲜嫩、高产的可持续发展模式。目前, 对该养殖系统的研究主要集中在系统优化、养殖品种筛选、

产品品质分析、综合效益分析等方面^[3-5]。与传统池塘养殖相比, IPRS 能提高大口黑鲈成活率、肌肉营养质量、肝脏生物学功能和抗氧化能力^[6]。养殖密度是池塘循环水养殖系统中重要的环境因子, 也是决定产量的关键因素。增加养殖密度是最大限度地提高集约化养殖模式产量的必然选择, 但高密度会使鱼类产生应激胁迫反应, 对其生长、行为、生理、肉质造成负面影响^[7-8], 因此探讨大口黑鲈在循环水养殖系统中的适宜放养密度,

收稿日期: 2019-10-26; 修订日期: 2019-12-16。

基金项目: 农业农村部现代农业产业技术特色淡水鱼体系项目(CARS-46); 中央级公益性科研院所基本科研业务费项目(2018JBFR01)

作者简介: 倪金金(1994-), 女, 硕士研究生, 专业方向为水产养殖. E-mail: Nijj84652167@163.com

通信作者: 徐跑, 研究员. E-mail: xup@ffrc.cn

有助于提高其养殖产量和经济效益。

目前,国内外有关养殖密度的研究报道很多。Liu等^[9]研究发现高密度养殖导致细鳞鲑幼鱼(*Brachymystax lenok*)特定生长率下降,同时高放养密度是水产动物体内活性氧增加(ROS)的主要应激源,这些ROS可能导致细胞氧化损伤,最终影响到鱼类成活率、鱼肉品质及抗病力^[10-11]。宋志飞等^[12]研究发现,过分提高养殖密度会打破俄罗斯鲟(*Acipenser gueldenstaedti*)幼鱼体内自由基的“稳态性动态平衡”。此外,高养殖密度还影响鱼类应激基因(*HSP70*和*SOD*)的表达。中华鲟(*Acipenser sinensis*)养殖密度实验表明,高密度组肝脏*HSP70*基因表达量显著上升^[13];同样,在橄榄牙鲃(*Paralichthys olivaceus*)实验中,高放养密度组肝脏*SOD* mRNA表达水平高于中、低密度组^[14]。

大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)又名加州鲈,是源自北美湖泊和河流的主要淡水鱼种。因其具有生长速度快、饲料转换率高、适应性强、肉质鲜美、肌间刺少等优点,深受养殖户与消费者的喜爱,是目前中国重要的淡水养殖鱼类之一,2017年全国养殖总量达45.7万t^[15]。加州鲈(*Micropterus salmoides*)池塘循环水养殖密度实验表明,高密度组鱼的生长在养殖后期受到抑制^[16],然而关于放养密度引起的加州鲈生理反应的机制研究却很少,因此本实验通过分析池塘工程化循环水养殖模式下养殖密度对大口黑鲈肝脏抗氧化能力、消化酶活性、组织结构以及*HSP70*、*SOD*基因表达的影响,旨在研究养殖密度对大口黑鲈影响的生理机制,为大口黑鲈池塘工程化循环水养殖模式日常养殖管理提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 实验鱼与实验设计

实验用鱼为同一批次、规格一致、健康无损的大口黑鲈幼鱼,初始体重(4.50 ± 0.23) g。将其随机分配到9个相同的流水槽中($22 \text{ m} \times 5 \text{ m} \times 2.5 \text{ m}$)。实验设计3个养殖密度,分别为 0.2 kg/m^3 (SD1)、 0.4 kg/m^3 (SD2)和 0.6 kg/m^3 (SD3),每个密度组3个重复。养殖实验周期持续120 d。

1.2 养殖水槽

养殖实验在中国水产科学研究院淡水渔业研究中心扬州中基地池塘工程化循环水生态养殖系统内进行。该系统由气提推水增氧区、养殖区($22 \text{ m} \times 5 \text{ m} \times 2.5 \text{ m}$)和集污区组成,其中流水槽养殖区域面积合计为 1320 m^2 ,占池塘环沟总面积的3.19%,剩余的池塘区域为净化区域。分别在养殖水槽前后端安装气提推水增氧装置和微孔增氧装置,保证每个水槽内溶氧充足。在净化区内放养三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)、花白鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)以及种植鱼腥草等水生植物对养殖尾水进行净化处理。养殖水源为长江水,水质清新无污染,符合《中华人民共和国渔业水质标准》(GB 11607-89)。

1.3 饲养管理

实验期间,采用饱食投喂法,每天6:00、10:00、14:00和17:00投喂4次膨化颗粒饲料(粗蛋白含量 $\geq 47\%$,粗脂肪含量 $\geq 5\%$,浙江欣欣天恩水产饲料有限公司)。根据鱼体质量的变化适时调整饲料的规格,并根据天气情况、摄食状态、水温等适当调整投喂量与投喂次数。每天观察鱼的摄食情况并记录好饲料的投喂量以及死鱼的数量。养殖期间,气提推水装置24 h开启以保证水体中溶解氧大于 5 mg/L ,水流速度为 $2 \sim 3 \text{ cm/s}$;水温为 $22.6 \sim 30.5 \text{ }^\circ\text{C}$,氨氮为 $0.06 \sim 0.62 \text{ mg/L}$,pH为 $7.5 \sim 8.22$,亚硝酸氮为 $0.18 \sim 0.33 \text{ mg/L}$ 。

1.4 样本采集

分别于养殖实验的第30天、60天、90天和120天采集样本。从每个水槽中随机捞取20尾鱼进行采样。解剖前,将鱼放入 100 mg/L 的MS-222中做快速麻醉。随后剖开腹部,剥离出内脏团,取出肝脏、肠道迅速放入液氮罐中带回实验室于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存,用于后期生理指标的测定以及分子水平的分析。

1.5 指标测定

1.5.1 抗氧化指标的测定 将肝脏样品按照重量(g):体积(mL)=1:9的比例加入9倍体积的生理盐水,高速匀浆,然后于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 3000 r/min ,离心 10 min ,取上清液,用于测定超氧化物歧化酶(SOD)、总抗氧化能力(T-AOC)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱

甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活性与丙二醛(MDA)及蛋白质含量。抗氧化指标的测定均采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒,具体测定过程参照试剂盒说明书。

1.5.2 消化酶活性的测定 用于测定肠道消化酶上清液的制备方法与肝脏上清液的制备方法相同。采用考马斯亮蓝法测定肠道组织中的蛋白浓度。分别采用酶淀粉比色法和酶比色法测定肠道淀粉酶与脂肪酶活力。所有样品的检测均按照试剂盒(购自南京建成生物工程研究所)操作说明书。

1.5.3 HSP70 与 Cu/Zn-SOD 基因表达的测定 用灭菌剪刀将所采肝脏剪成小块,取适量放入 1.5 mL 的离心管中,按照 MiniBEST Universal RNA Extraction Kit (TaKaRa 公司)说明书提取大口黑鲈肝脏总 RNA,通过琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测其质量和浓度,OD_{260/280} 保持在 1.8~2.0。使用 TaKaRa PrimeScript™ 1st Strand

cDNA Synthesis Kit 试剂盒的方法反转录合成 cDNA,并将其保存在-20 ℃待用。使用 Primer Premier 5.0 软件设计定量引物(表 1),引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成,对引物进行 PCR 扩增,计算出扩增效率在 0.9~1.1 之间。大口黑鲈 HSP70、Cu/Zn-SOD 荧光定量引物基于基因库中已知的 HSP70、SOD (GeneBank 数据库登录号为 FJ751227.1; FJ030929.1)序列而设计,其中 β -actin^[17]与 18S^[18]为内参基因。使用 TaKaRa 公司的 SYBR Prime Script™ RT-PCR Kit 试剂盒对大口黑鲈肝脏 HSP70、SOD、 β -actin、18S 基因的 cDNA 进行定量分析。Real Time PCR 反应程序为:95 ℃ 30 s,然后 40 个循环:95 ℃ 5 s,58 ℃ 10 s,熔解的反应条件为 65~95 ℃,读板 30 s 记录荧光量。以 β -actin 与 18S 为内参对得到的各样本的 C_t值做均一化处理,应用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算 SD1、SD2、SD3 组肝脏 HSP70、Cu/Zn-SOD 的表达量。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物
Tab. 1 Gene-specific real-time quantitative PCR primers

引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence(5'-3')	产物长度/bp length of products	退火温度/℃ annealing temperature
β -actin-F	ATCGCCGCACTGGTTGTTGAC	187	58
β -actin-R	CCTGTTGGCTTTGGGGTTC		
18S-F	GGACACGGAAGGATTGACAG	182	58
18S-R	GGACACGGAAGGATTGACAG		
HSP70-F	CAGTGATGAAGACAAGCAGAAGA	163	57
HSP70-R	GCCACCAGCACTCTGATACA		
SOD-F	ACCACAGAACTTACGCGACA	131	60
SOD-R	TTCACAGGGTCTGAATCGCC		

1.5.4 肝脏、肠道切片的制作与观察 取实验鱼前肠、肝脏组织于 10%福尔马林中固定 24 h,依次经过 70%、80%、90%、95%酒精和无水酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,用切片机(德国,Leica RM2235)切片(5 μ m),然后用苏木素和伊红染色,中性树胶封片。采用显微镜(Leica DM4B)观察肠道与肝脏组织(肠道放大倍数为 100,肝脏放大倍数为 200),采用 LAS V4.7 软件测量肠道肌层厚度、肠道绒毛长度以及厚度。

1.6 数据处理

所获得的数据均采用 SPSS19.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA),然后对差异显

著的数据($P<0.05$)作 LSD 法多重比较。实验数据以平均值 $\pm$ 标准误($\bar{x}\pm SE$)表示。

2 结果与分析

2.1 养殖密度对大口黑鲈肝脏抗氧化能力的影响

养殖密度对大口黑鲈肝脏抗氧化能力的影响见图 1。图 1a 和图 1b 显示,在 30 d、60 d、90 d 时,各养殖密度组肝脏 SOD 与 CAT 活力没有显著差异($P>0.05$),而在 120 d 时,SD1 组 SOD 活力显著高于其他两组($P<0.05$),SD1 和 SD2 组 CAT 活力显著高于 SD3 组($P<0.05$)。由图 1c 可知,肝脏 MDA 含量在养殖前 60 d 未受到养殖密度的影响

($P>0.05$), 在 90 d 时, SD3 组显著高于 SD1 组 ($P<0.05$), 在 120 d 时, SD3 组显著高于 SD1 和 SD2 组 ($P<0.05$)。养殖密度对肝脏 T-AOC 与 GSH-PX 活力无显著性影响 ($P>0.05$)。

2.2 养殖密度对大口黑鲈肠道消化酶活力的影响

图 2 结果显示, 养殖密度对大口黑鲈肠道淀粉酶(图 2a)和脂肪酶活力(图 2b)的影响不显著 ($P>0.05$)。

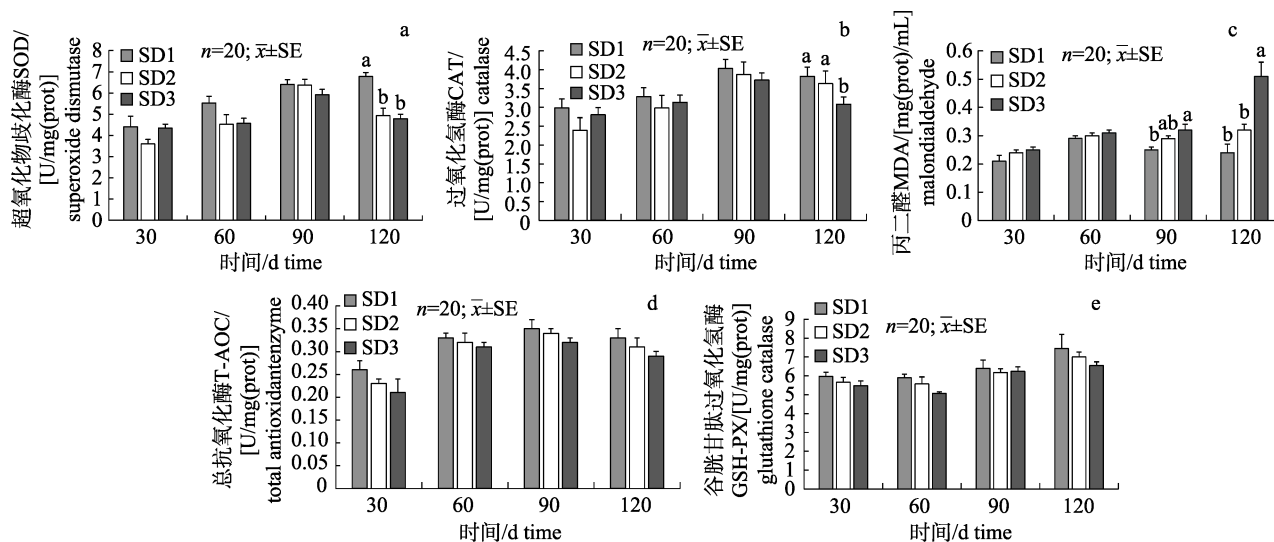


图 1 池塘工程化循环水养殖模式下养殖密度对大口黑鲈肝脏抗氧化能力的影响

SD1: 0.2 kg/m³; SD2: 0.4 kg/m³; SD3: 0.6 kg/m³; 柱上方不同的小写字母表示同一时间不同密度之间差异显著 ($P<0.05$)。

Fig. 1 Effects of stocking density on antioxidant capacity in the liver of *Micropterus salmoides* reared in IPRS
SD1: 0.2 kg/m³; SD2: 0.4 kg/m³; SD3: 0.6 kg/m³. Different small letters indicate significant differences between different groups at the same time ($P<0.05$).

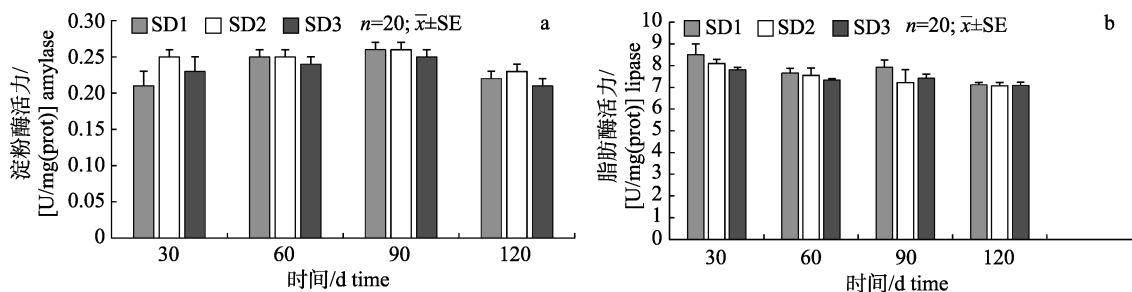


图 2 池塘工程化循环水养殖模式下养殖密度对大口黑鲈肠道部分消化酶活力的影响

SD1: 0.2 kg/m³; SD2: 0.4 kg/m³; SD3: 0.6 kg/m³; 柱上方不同的小写字母表示同一时间不同密度之间差异显著 ($P<0.05$)。

Fig. 2 Effects of different stocking density on partial intestinal digestive enzyme activities of *Micropterus salmoides* reared in IPRS
SD1: 0.2 kg/m³; SD2: 0.4 kg/m³; SD3: 0.6 kg/m³. Different small letters indicate significant differences between different groups at the same time ($P<0.05$).

2.3 养殖密度对大口黑鲈肝脏 HSP70、Cu/Zn-SOD 基因表达的影响

图 3 结果显示, 大口黑鲈肝脏 HSP70(图 3a)、Cu/Zn-SOD mRNA(图 3b)相对表达水平呈现先升高后下降的趋势, 且在 30 d 和 60 d 时, 未受到养殖密度的影响 ($P>0.05$); 90 d 时, HSP70 表达量在

SD3 组中达到最大值, 显著高于其他两组 ($P<0.05$); 120 d 时, HSP70 表达量随养殖密度的增加而显著升高 ($P<0.05$)。同样的, Cu/Zn-SOD 表达量在 90 d 和 120 d 差异显著, 90 d 时 SD1 组显著高于其他组 ($P<0.05$), 在 120 d 时, 各组之间差异显著 ($P<0.05$)。

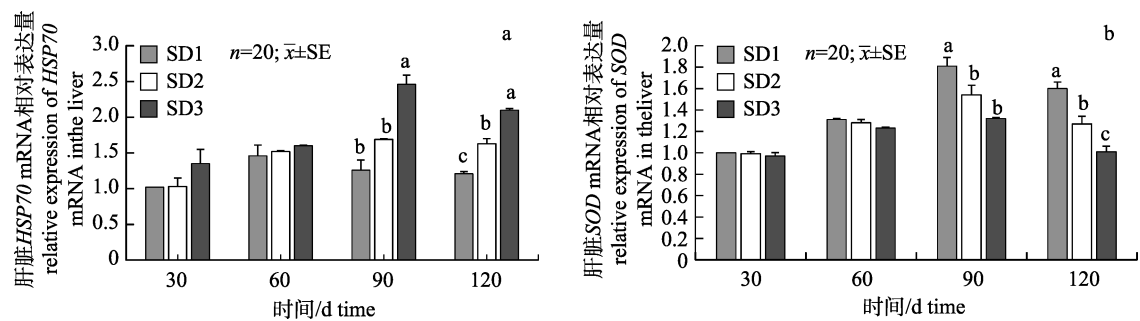


图3 池塘工程化循环水养殖模式下不同养殖密度对大口黑鲈肝脏 *HSP70* (a)、*SOD* (b)基因相对表达量的影响
SD1: 0.2 kg/m³; SD2: 0.4 kg/m³; SD3: 0.6 kg/m³; 柱上方不同的小写字母表示同一时间不同密度之间差异显著($P<0.05$).

Fig. 3 Effects of stocking density on relative expression of *HSP70* (a) and *SOD* genes (b) in liver of *Micropterus salmoides* reared in IPRS
SD1: 0.2 kg/m³; SD2: 0.4 kg/m³; SD3: 0.6 kg/m³. Different small letters indicate significant differences between different groups at the same time ($P<0.05$).

2.4 养殖密度对大口黑鲈肝脏、肠道组织结构的影响

养殖密度对大口黑鲈肝脏和肠道结构的影响如图4、图5所示。由图4看出,本实验所设养殖密度未对大口黑鲈肝脏造成病理性的破坏,实验结束时SD1、SD2实验组鱼肝脏内肝细胞结构正常,排列规则,血管清晰,肝细胞形态呈圆形,细

胞核位于细胞中央,肝脏空泡很小(图4a,图4b),而SD3组肝脏基本结构未出现异常,空泡相对变大(图4c)。不同养殖密度组大口黑鲈肠道绒毛长度和绒毛厚度无显著差异($P>0.05$),但肌层厚度随养殖密度的增加而减小,与SD1和SD2相比,SD3组肌层厚度最小($P<0.05$,表2)。图5表明,各密度组肠微绒毛组织结构完整,而高放养密度对大

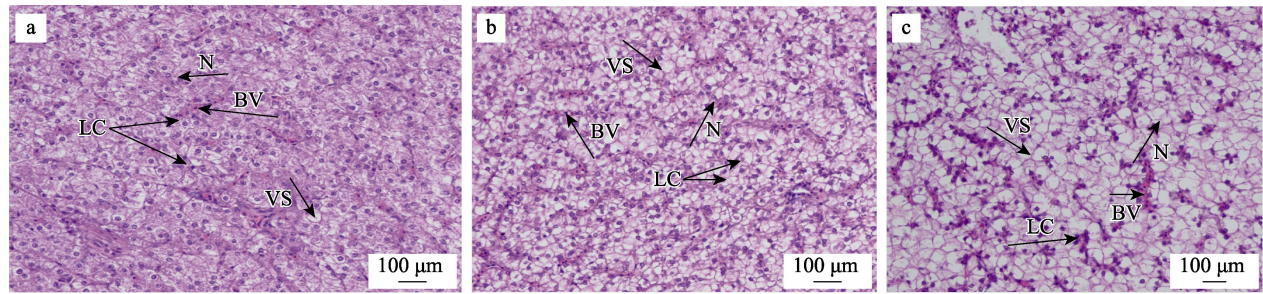


图4 池塘工程化循环水养殖模式下养殖密度对大口黑鲈肝脏显微结构的影响

a. SD1组: 肝细胞结构正常, 示血管(BV)、肝细胞(LC)、细胞核(N)、空泡(VS); b. SD2组: 肝细胞结构清晰, 出现少量小的空泡; c. SD3组: 肝细胞间空泡增多、增大, 但未发现肝细胞出血性坏死、受损。
Fig. 4 Effects of stocking density on histological structure of liver in *Micropterus salmoides* reared in IPRS
a. Structure of normal liver cell of SD1 group (0.2 kg/m³), showing blood vessel (BV), liver cells (LC), nucleus (N), and vacuole structure (VS); b. Structure of liver exposed to SD2 (0.4 kg/m³), showing the hepatocytes cellular structure was clear, and a small amount of small vacuoles were observed; c. Structure of liver of SD3 group (0.6 kg/m³), showing the size and number of vacuoles were increased, and the structure of liver cell was not damaged.

表2 池塘工程化循环水养殖模式下养殖密度对加州鲈肠道组织指标的影响

Tab. 2 The effect of stocking density on the indexes of intestinal tissue in *Micropterus salmoides*

项目 item	采样时间/d sampling time	组别 group		
		SD1	SD2	SD3
肌层厚度/μm musculus layer thickness	120	203.88±14.79 ^a	197.40±14.11 ^a	139.53±6.29 ^b
绒毛长度/μm villi length	120	419.67±69.60	429.86±60.46	423.92±99.05
绒毛厚度/μm villi thickness	120	122.87±6.44	116.38±6.80	108.53±8.25

注: 同一行数据后不同字母表示各组差异显著($P<0.05$).
Note: Different letters in the same line mean significant difference among different groups ($P<0.05$).

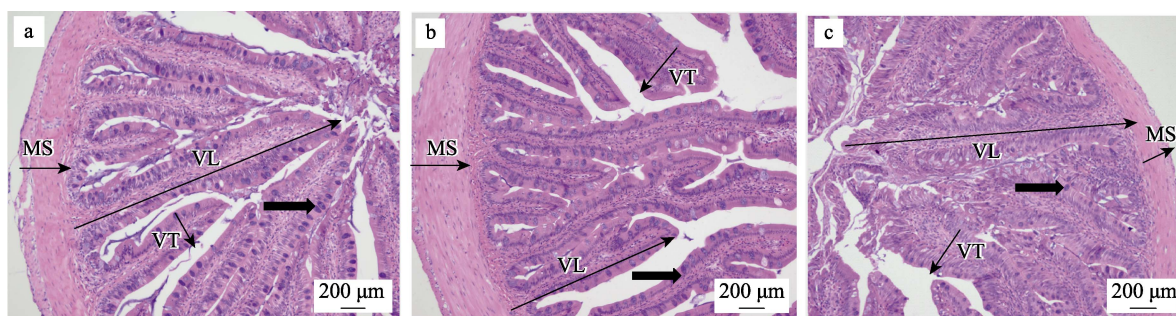


图 5 池塘工程化循环水养殖模式下养殖密度对大口黑鲈肠道显微结构的影响

- a. SD1 组: 肠道组织正常, 示肌层厚度(MS)、绒毛长度(VL)、绒毛厚度(VT)、杯状细胞(GC, 粗箭头)数量多且较大;
b. SD2 组: 肌层厚度(MS)、绒毛长度(VL)、绒毛厚度(VT)正常, 杯状细胞(粗箭头)变小且数量相对变少;
c. SD3 组: 肌层厚度(MS)减小, 杯状细胞(粗箭头)数量和大小明显下降。

Fig. 5 Effects of stocking density on histological structure of intestine in *Micropterus salmoides* reared in IPRS

- a. Structure of normal intestine of SD1 group (0.2 kg/m^3), showing muscularis layer (MS), villi length (VL), villi thickness (VT), and goblet cells (GC, bold arrows) were numerous and relatively large; b. Structure of intestine of SD2 group (0.4 kg/m^3), showing normal muscularis layer (MS), villi length (VL), villi thickness (VT), and relative decrease of the number and size of goblet cells (GC, bold arrows); c. Structure of intestine of SD3 group (0.6 kg/m^3), showing the declined thickness of muscularis layer, and a marked decrease of the number and size of GC (bold arrows).

口黑鲈肠杯状细胞的数量和大小有负面影响。与 SD1 组相比, SD3 组中杯状细胞的数量减少或体积缩小(图 5)。

3 讨论

3.1 养殖密度对大口黑鲈肝脏抗氧化能力的影响

鱼类在正常的生命活动中会产生新的自由基, 它是鱼体内不可缺少的活性物质, 能够完成各种生理和生化调节活动, 但过量的自由基会对鱼体内细胞、组织甚至其他活性物质造成损害^[19]。生物体内 SOD、CAT、GSH-PX 等抗氧化酶是机体防御自由基的第一道酶防线, 故常用来作为机体受到氧化胁迫的指标^[20-21]。

SOD 和 CAT 是两种重要的抗氧化酶, 去除自由基的第一步是 SOD 将细胞内氧自由基(O_2^-)转化为过氧化氢(H_2O_2)和分子氧(O_2), 此后 CAT 将 H_2O_2 分解成分子氧(O_2)和水(H_2O)以降低其毒性^[22]。本实验中, 在 90 d 时, 肝脏 SOD、CAT 活性在各密度组间没有出现差异, 而在 120 d 时, SD3 组显著低于 SD1 组, 笔者认为这是大口黑鲈对养殖密度引起持续应激的反应, 随着养殖时间的延长, 鱼的体重和体长不断增大, 高养殖密度引起的胁迫抑制了鱼体的抗氧化能力, 密度越高, 鱼的组织氧化损伤越严重, 这和研究者对吉富罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[23]、俄罗斯鲟 (*Acipenser*

gueldenstaedti)^[12]和大菱鲈 (*Scophthalmus maximus*)^[24] 的养殖密度实验得出的结论一致。相反, 宋文华^[25] 研究发现, 养殖密度对草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 肝脏 SOD 与 CAT 酶活性没有显著影响。MDA 是脂质过氧化后的分解产物, 被认为是细胞氧化损伤和肝胰脏损伤程度的重要标志之一, 养殖密度过高诱发产生的自由基会直接攻击膜中的多不饱和脂肪酸, 引发脂质过氧化反应^[26-27]。本研究中, 养殖前 60 d, 养殖密度对大口黑鲈肝脏 MDA 含量无显著的影响, 而在 90 d 和 120 d 时, SD3 组鱼肝脏 MDA 含量显著高于 SD1 组, 且随着养殖时间的延长, 差异性越来越明显, 表明密度胁迫使鱼体内氧自由基增多, 脂质过氧化反应增强, 该结果与褐斑牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*)^[28]、中华鲟^[13]的研究结果一致; 相反, 在尼罗罗非鱼 (*Oreochromis nilopenaeus*)^[29] 和凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)^[30] 研究中发现, MDA 值随着放养密度的增加而降低, 而放养密度对大菱鲈^[24]、非洲鲇 (*Clarias gariepinus*) MDA 含量没有造成影响^[31]。本实验结果显示, 肝脏 GSH-PX 与 T-AOC 活性在不同养殖密度组之间没有差异, 这表明大口黑鲈体内不同的抗氧化酶对养殖密度的应激反应不一样。彭士明等^[32] 在对银鲈 (*Pampus argenteus*) 幼鱼的研究中也得到了类似的结果。抗氧化指标研究结果的差异可能是由于不同的鱼类

具有不同的抗氧化能力和调节机制,导致对养殖密度不同的应激反应。但是,从实验结果来看,过度增加养殖密度可能会破坏大口黑鲈体内自由基稳态性平衡,造成氧化损伤。

3.2 养殖密度对大口黑鲈消化酶活力的影响

肠道是营养物质代谢的主要场所,在消化过程中发挥着重要的作用。检测和分析消化酶活性有助于了解鱼类的消化状态。本实验结果显示,大口黑鲈肠道中淀粉酶活性比脂肪酶活性小得多,这是由于大口黑鲈是偏肉食性鱼类,具有很低的消化碳水化合物的能力,而肠道是消化脂肪的主要部位,所以脂肪酶的活性相对比较高。不同密度组肠道淀粉酶、脂肪酶活力在 120 d 内没有差异,表明养殖密度未对大口黑鲈肠道淀粉酶、脂肪酶活力造成影响。而 Liu 等^[29]对尼罗罗非鱼的研究发现,肝脏中淀粉酶与脂肪酶活性随着养殖密度的升高而降低,类似地,彭士明等^[33]研究指出,在适宜的密度范围内,银鲳鱼具有良好的消化生理功能,而较高的养殖密度会降低其消化酶活性。相反,在花鳗鲡(*Anguilla marmorata*)实验中,中密度组肠道脂肪酶活力却低于高密度组^[34]。不同研究者关于养殖密度对鱼类消化酶活性的影响结果存在差异可能与鱼的种类和生长阶段、组织部位、实验条件的不同有关。

3.3 养殖密度对大口黑鲈肝脏 HSP70、Cu/Zn-SOD 基因表达的影响

机体在受到化学应激、热应激和拥挤等多种应激源的诱导下,组织细胞会产生热休克蛋白来抵抗应激以维持平衡。HSP70 是 HSPs 家族中进化最保守最重要的成员,具有免疫保护、分子伴侣、抗氧化应激等作用,因此可以作为拥挤应激的生物标志物^[35-36]。本研究中,SD3 组大口黑鲈肝脏 HSP70 mRNA 表达水平在 90 d 和 120 d 时显著升高,说明高养殖密度对实验鱼产生了胁迫效应,密度应激诱导了 HSP70 在大口黑鲈肝脏中的表达,这与研究者对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[37]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[38]和大菱鲆^[24]的实验结果类似。Basu 等^[39]指出,随着应激时间的增加,鱼体内长期的高皮质醇水平会降低

HSP70 mRNA 表达水平。本实验中,与 90 d 相比,120 d 时 SD3 组大口黑鲈肝脏 HSP70 mRNA 表达水平下降,这可解释为当应激程度过大、持续时间持久时,鱼体内的细胞膜和蛋白结构发生异常,导致 HSP70 亚细胞分布发生变化,降低 HSP70 mRNA 水平并减弱鱼的免疫能力,这可能与皮质醇的调控作用有关,类似的结果在尼罗罗非鱼^[40]和虹鳟^[38]的研究中也观察到。在对黑虎虾(*Penaeus monodon*)的研究中发现,水质恶化会引起肝胰脏 HSP70 表达量的下降^[41],而本实验中,养殖用水的循环流动及净化区的净化作用使得水质保持在能够确保大口黑鲈正常需求的水平。

SOD 是动植物体内普遍存在的金属酶,起着维持体内 O_2^- 动态平衡的重要作用。目前只发现了 4 种 SOD,分别为铜/锌 SOD(Cu/Zn SOD)、锰 SOD(Mn SOD)、铁 SOD(Fe SOD)和镍 SOD(Ni SOD)^[42]。研究表明,鱼类在遭受禁食、温度、重金属、氨氮等外界胁迫时,体内 SOD 基因表达会发生变化。Kim 等^[43]研究发现,在重金属离子和高养殖水温的共同胁迫下,盘鲍(*Haliotis discus discus*)胞内型 Cu/Zn-SOD 和线粒体中的 mMSOD 基因表达上调;Wang 等^[44]研究报道,氨氮和硝态氮胁迫促使黄姑鱼(*Nibea albiflora*)肝脏、鳃和头肾中 Mn SOD 基因的表达量上升,而有关拥挤胁迫对鱼类 SOD 基因表达影响的研究未见报道。本研究中,大口黑鲈肝脏 Cu/Zn-SOD 基因表达量呈先升高后下降的趋势,Cu/Zn-SOD 基因表达量的增加是为了及时清除由养殖密度应激所产生的氧自由基,而 90 d 和 120 d 的下降是因为随着鱼体的不断生长,密度应激强度越来越大,使得肝脏无法维持氧自由基的平衡,而 SD3 组的放养密度最高,所受的应激最强,因此在实验结束时 SD3 组肝脏 CuZn-SOD 基因的表达量显著低于其他两组,这与肝脏 SOD 酶活的结果相吻合。在橄榄牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)30 d 的密度胁迫实验中,高放养密度组肝脏 SOD mRNA 表达水平高于中、低密度组^[14],出现结果的差异可能是由于实验条件、实验时间以及鱼种的不同引起的,有关这方面的研究比较稀少,具体原因还需进一步探讨。

3.4 养殖密度对大口黑鲈肝脏、肠道组织结构的影响

肝脏是鱼类进行各种代谢途径的主要器官, 极易受到外界环境的影响, 对外部应激极其敏感^[45]。研究表明, 当鱼类肝脏受到外界环境胁迫时, 水肿变性、混浊变性、空泡化、肝细胞坏死是其遭到损伤后的典型变化^[46], 根据肝脏形态学的变化可以评估其所受的损伤程度。研究者在对虹鳉^[47]和四指马鲛(*Eleutheronema tetradactylum*)^[48]的研究中发现, 温度胁迫应激下, 肝脏出现细胞坏死、脂肪变性和水泡变性程度加重等情况。对摄食含有共轭亚油酸饲料的鲈鱼肝脏形态学分析表明, 肝细胞在肝窦周围呈规则形状, 胞浆脂质空泡化减少, 导致肝细胞数量减少^[49]。然而, 目前还未见有关养殖密度对鱼类肝脏形态影响的报道。本研究中, 实验结束时, 3个密度组大口黑鲈肝脏结构完整, 肝细胞排列紧密, 未出现细胞坏死、细胞膜破裂等现象, 仅仅发现SD3组细胞间空泡最大。

肠道是鱼类重要的消化场所, 肠道组织的完整是其行使消化能力的前提, 研究肠道形态是了解鱼类正常生理或异常状态的必要条件, 目前关于养殖密度对鱼类肠道形态影响的报道不多。本实验中, 随着养殖密度的增加, 肠道肌层厚度减少, 这与Abdalqadir^[50]研究结果一致, 而不同放养密度组绒毛厚度、绒毛长度无显著差异。Uni等^[51]认为绒毛高度的增加也可能意味着更大的吸收面积, 鱼类的消化能力更好。本实验结果表明设计的养殖密度未影响鱼类肠道结构, 这与本实验中淀粉酶、脂肪酶活力无差异相吻合。此外, 切片图显示, 与SD1和SD2相比, SD3组杯状细胞明显减少, Refaey等^[52]在对斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)的实验中也发现了类似的结果。本实验中放养密度对大口黑鲈肠杯状细胞的数量和大小虽然有负面影响, 但是并未影响肠道的消化吸收功能。

4 结论

在本实验条件下, 养殖密度会影响大口黑鲈的生理状态, 尤其是在养殖后期, 高养殖密度组鱼体抗氧化以及免疫功能受到抑制, 肝脏和肠道

结构会产生轻微损伤, 0.2 kg/m³密度组大口黑鲈的生理状况最好。另外, 基于本实验结果, 从生产实际角度考虑, 建议池塘工程化循环水养殖大口黑鲈的放养密度控制在0.2~0.4 kg/m³。

参考文献:

- [1] Wang P, Xu G C, Xu P. Temporal and spatial variation of dissolved oxygen and reaction of bacterial community in in-pond raceway system (IPRS) of largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2019, 43(6): 1290-1299. [王朋, 徐钢春, 徐跑. 大口黑鲈池塘工程化循环水养殖系统的溶解氧时空变化及菌群响应特征[J]. 水生生物学报, 2019, 43(6): 1290-1299.]
- [2] Zhang M Y, Zhuge Y, Xu X Y, et al. Fish-shrimp co-cultivation model test in industrial ecological aquaculture system of pond[J]. Journal of Aquaculture, 2017, 38(3): 20-22. [张茂友, 诸葛燕, 徐雪英, 等. 池塘工业化生态养殖系统鱼虾共养模式试验[J]. 水产养殖, 2017, 38(3): 20-22.]
- [3] Meng S L, Li D D, Qiu L P, et al. Community structure of zooplankton in an industrial eco-aquaculture system in a blunt-snout bream *Megalobrama amblycephala* culture pond[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2018, 33(1): 57-64. [孟顺龙, 李丹丹, 裘丽萍, 等. 团头鲂池塘工业化生态养殖系统中浮游动物群落特征分析[J]. 大连海洋大学学报, 2018, 33(1): 57-64.]
- [4] Li R C, Zhu C G, Sun R. Experiment on poly-culture of common carp and black carp in pond and analysis on its economical benefit[J]. Scientific Fish Farming, 2009(9): 42-43. [李如潮, 朱春革, 孙然. 池塘主养鲤鱼套养青鱼试验及经济效益分析[J]. 科学养鱼, 2009(9): 42-43.]
- [5] Harimana Y, Tang X, Xu P, et al. Effect of long-term moderate exercise on muscle cellularity and texture, antioxidant activities, tissue composition, freshness indicators and flavor characteristics in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. Aquaculture, 2019, 510: 100-108.
- [6] Yuan J L, Ni M, Liu M, et al. Analysis of the growth performances, muscle quality, blood biochemistry and antioxidant status of *Micropterus salmoides* farmed in in-pond raceway systems versus usual-pond systems[J]. Aquaculture, 2019, 511: 734241.
- [7] Kristiansen T S, Fernö A, Holm J C, et al. Swimming behaviour as an indicator of low growth rate and impaired welfare in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) reared at three stocking densities[J]. Aquaculture, 2004, 230(1-4): 137-151.
- [8] Xiong M, Onxayvieng K, Li D P, et al. Effect of acute crowding stress on the ubiquitin-proteasome system in the muscle of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2019, 26(3): 427-435. [熊梅, Kommaly Onxayvieng, 李大鹏, 等. 急性拥挤胁迫对草鱼肌肉泛素-蛋白酶体系统活性的影响[J]. 中国水产科学, 2019, 26(3): 427-435.]

- [9] Liu Y, Liu H B, Wu W H, et al. Effects of stocking density on growth performance and metabolism of juvenile Lenok (*Brachymystax lenok*)[J]. Aquaculture, 2019, 504: 107-113.
- [10] Senso L, Suárez M D, Ruiz-Cara T, et al. On the possible effects of harvesting season and chilled storage on the fatty acid profile of the fillet of farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*)[J]. Food Chemistry, 2007, 101(1): 298-307.
- [11] Sayeed I, Parvez S, Pandey S, et al. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2003, 56(2): 295-301.
- [12] Song Z F, Wen H S, Zhao Y F, et al. Effects of stocking density on the non-specific immune functions of juvenile Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti*) in flowing water cultivation[J]. Guangxi Sciences, 2017, 24(4): 389-395. [宋志飞, 温海深, 赵艳飞, 等. 流水养殖条件下养殖密度对俄罗斯鲟幼鱼非特异性免疫的影响[J]. 广西科学, 2017, 24(4): 389-395.]
- [13] Long L N, Zhang H G, Ni Q, et al. Effects of stocking density on growth, stress, and immune responses of juvenile Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) in a recirculating aquaculture system[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2019, 219: 25-34.
- [14] Choi C Y, Choi J Y, Choi Y J, et al. Effects of green wavelength light on antioxidant and non-specific immune responses of the olive flounder *Paralichthys olivaceus* maintained at different stocking densities[J]. Aquacultural Engineering, 2019, 84: 23-28.
- [15] Fan J J, Bai J J, Li S J, et al. Nutrient composition and nutritive quality of the muscle of *Micropterus salmoides*, “Youlu No. 1”[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(3): 423-429. [樊佳佳, 白俊杰, 李胜杰, 等. 大口黑鲈“优鲈 1 号”选育群体肌肉营养成分和品质评价[J]. 中国水产科学, 2012, 19(3): 423-429.]
- [16] Wang Y Y, Xu P, Nie Z J, et al. Growth performance and serum biochemical parameters of juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*) reared at different stocking densities in an in-pond raceway recirculating culture system[J]. Freshwater Fisheries, 2019, 49(3): 90-95. [王裕玉, 徐跑, 聂志娟, 等. 池塘工程化循环水养殖模式下养殖密度对大口黑鲈生长性能和生理指标的影响[J]. 淡水渔业, 2019, 49(3): 90-95.]
- [17] Chen N S, Zhou J, Jin L N, et al. Effects of fasting on growth and expression abundance of IGF-I mRNA in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(4): 713-720. [陈乃松, 周洁, 靳利娜, 等. 禁食对大口黑鲈生长和肝脏 IGF-I mRNA 表达丰度的影响[J]. 中国水产科学, 2010, 17(4): 713-720.]
- [18] Fan J J, Bai J J, Li X H, et al. Ghrelin cDNA structure and expression profile in early development of largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(11): 1656-1663. [樊佳佳, 白俊杰, 李小慧, 等. 大口黑鲈生长激素促分泌素 cDNA 结构和早期发育阶段表达谱分析[J]. 水产学报, 2010, 34(11): 1656-1663.]
- [19] Fang Y Z, Yang S, Wu G Y. Free radicals, antioxidants, and nutrients in relation to health[J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2003, 25(4): 337-343. [方允中, 杨胜, 伍国耀. 自由基、抗氧化剂、营养素与健康的关系[J]. 营养学报, 2003, 25(4): 337-343.]
- [20] Ahmad I, Hamid T, Fatima M, et al. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure[J]. Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects, 2000, 1523(1): 37-48.
- [21] Costas B, Aragão C, Dias J, et al. Interactive effects of a high-quality protein diet and high stocking density on the stress response and some innate immune parameters of Senegalese sole *Solea senegalensis*[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2013, 39(5): 1141-1151.
- [22] Ye J D, Han Y W, Zhao J W, et al. Effects of dietary olaquinox on antioxidant enzymes system in hepatopancreas of *Cyprinus carpio*[J]. Journal of Fisheries of China, 2004, 28(3): 231-235. [叶继丹, 韩友文, 赵吉伟, 等. 喹乙醇对鲤肝胰脏抗氧化酶系统的影响[J]. 水产学报, 2004, 28(3): 231-235.]
- [23] Qiang J, Xu P, He J, et al. The combined effects of external ammonia and crowding stress on growth and biochemical activities in liver of (GIFT) Nile tilapia juvenile (*Oreochromis niloticus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(12): 1837-1848. [强俊, 徐跑, 何杰, 等. 氨氮与拥挤胁迫对吉富品系尼罗罗非鱼幼鱼生长和肝脏抗氧化指标的联合影响[J]. 水产学报, 2011, 35(12): 1837-1848.]
- [24] Liu B L, Jia R, Han C, et al. Effects of stocking density on antioxidant status, metabolism and immune response in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2016, 190: 1-8.
- [25] Song W H. The effects of stocking density and water temperature on growth and physiological parameters of grass carp[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012. [宋文华. 养殖密度和温度对草鱼生长和生理生化指标的影响[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.]
- [26] Olsen R E, Sundell K, Mayhew T M, et al. Acute stress alters intestinal function of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)[J]. Aquaculture, 2005, 250(1-2): 480-495.
- [27] Sahin K, Yazlak H, Orhan C, et al. The effect of lycopene on antioxidant status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared under high stocking density[J]. Aquaculture, 2014, 418-419: 132-138.
- [28] Li J, Tang X, Zhang L Y, et al. Study on the energy metabolism and oxidative stress of juvenile brown flounder, *Paralichthys olivaceus* in dissolved oxygen content descending water[J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2015, 31(1): 22-27. [李洁, 唐夏, 张灵燕, 等. 溶解氧水平对褐牙鲆幼鱼能量代谢和氧化应激的影响研究[J]. 广西科学院学报, 2015, 31(1): 22-27.]
- [29] 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.
- [30] Liu G, Zhu S M, Liu D Z, et al. Effects of stocking density of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) on immunities, antioxidant status, and resistance against *Vibrio harveyi* in a biofloc system[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 67: 19-26.
- [31] Wang X M, Dai W, Xu M, et al. Effects of stocking density on growth, nonspecific immune response, and antioxidant status in African catfish (*Clarias gariepinus*)[J]. The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgah, 2013, 65: 1-6.
- [32] Peng S M, Shi Z H, Sun P, et al. Effects of breeding density on the growth and tissues biochemical indices of juvenile silver pomfret (*Pampus argenteus*)[J]. Chinese Journal of Ecology, 2010, 29(7): 1371-1376. [彭士明, 施兆鸿, 孙鹏, 等. 养殖密度对银鲳幼鱼生长及组织生化指标的影响[J]. 生态学杂志, 2010, 29(7): 1371-1376.]
- [33] Peng S M, Lin S Z, Shi Z H, et al. Effects of rearing density on growth rate and digestive enzyme activity of juvenile *Pampus argenteus*[J]. Marine Fisheries, 2013, 35(1): 72-76. [彭士明, 林少珍, 施兆鸿, 等. 饲养密度对银鲳幼鱼增重率及消化酶活性的影响[J]. 海洋渔业, 2013, 35(1): 72-76.]
- [34] Tan C X, Sun D C, Tan H X, et al. Effects of stocking density on growth, body composition, digestive enzyme levels and blood biochemical parameters of *Anguilla marmorata* in a recirculating aquaculture system[J]. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2018, 18: 9-16.
- [35] Kim J H, Dahms H U, Han K N. Biomonitoring of the river pufferfish, *Takifugu obscurus* in aquaculture at different rearing densities using stress-related genes[J]. Aquaculture Research, 2013, 44(12): 1835-1846.
- [36] Viant M R, Werner I, Rosenblum E S, et al. Correlation between heat-shock protein induction and reduced metabolic condition in juvenile steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) chronically exposed to elevated temperature[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2003, 29(2): 159-171.
- [37] Gao Y, He Z L, Vector H, et al. Effect of stocking density on growth, oxidative stress and HSP70 of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2017, 17: 877-844.
- [38] Zahedi S, Akbarzadeh A, Mehrzad J, et al. Effect of stocking density on growth performance, plasma biochemistry and muscle gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Aquaculture, 2019, 498: 271-278.
- [39] Basu N, Kennedy C J, Iwama G K. The effects of stress on the association between hsp70 and the glucocorticoid receptor in rainbow trout[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2003, 134(3): 655-663.
- [40] Jun Q, Hong Y, Hui W, et al. Physiological responses and HSP70 mRNA expression in GIFT tilapia juveniles, *Oreochromis niloticus* under short-term crowding[J]. Aquaculture Research, 2015, 46(2): 335-345.
- [41] Nga B T, Lüring M, Peeters E T H M, et al. Chemical and physical effects of crowding on growth and survival of *Penaeus monodon* Fabricius post-larvae[J]. Aquaculture, 2005, 246(1-4): 455-465.
- [42] Wuerges J, Lee J W, Yim Y I, et al. Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(23): 8569-8574.
- [43] Kim K Y, Lee S Y, Cho Y S, et al. Molecular characterization and mRNA expression during metal exposure and thermal stress of copper/zinc- and manganese-superoxide dismutases in disk abalone, *Haliotis discus discus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 23(5): 1043-1059.
- [44] Wang X L, Song Q, Wang Z Y, et al. Characterizations of intracellular copper/zinc superoxide dismutase from yellow drum (*Nibea albiflora*, Richardson 1846) and its gene expressions under the ammonia/nitrite stress[J]. Aquatic Toxicology, 2019, 214: 105254.
- [45] Huang B M, Yuan L G, Qu Y L, et al. The morphology study of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2013, 48(1): 31-36. [黄布敏, 袁莉刚, 曲亚玲, 等. 虹鳟胆管系统组织学观察[J]. 甘肃农业大学学报, 2013, 48(1): 31-36.]
- [46] El-Bakary N E R, El-Gammal H L. Comparative histological, histochemical and ultrastructural studies on the liver of flat-head grey mullet (*Mugil cephalus*) and sea bream (*Sparus aurata*)[J]. Global Veterinaria, 2010, 4(6): 548-553.
- [47] Zhou Y J. Effects of continuing heat stress on heat-shock protein HSP90 α and HSP10 mRNA expression, tissue injury and blood cell apoptosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2017. [周彦静. 持续热应激下虹鳟热应激蛋白基因 HSP90 α 和 HSP10 mRNA 表达、组织损伤及血细胞凋亡变化[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2017.]
- [48] Liu Q Q. The effects of operation and low temperature stress on organization structure, antioxidant system of juvenile *Eleutheronema tetradactylum*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017. [刘奇奇. 操作及低温胁迫对四指马鲛幼鱼组织结构和抗氧化系统的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.]
- [49] Makol A, Torrecillas S, Fernández-Vaquero A, et al. Effect of conjugated linoleic acid on dietary lipids utilization, liver morphology and selected immune parameters in sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2009, 154(2): 179-187.
- [50] Abdalqadir A M. Nutritional and physiological studies of probiotic on freshwater fish[D]. Al-Mansoura: Mansoura University, 2014.
- [51] Uni Z, Noy Y, Sklan D. Posthatch changes in morphology and function of the small intestines in heavy- and light-strain chicks[J]. Poultry Science, 1995, 74(10): 1622-1629.
- [52] Refaey M M, Li D P, Tian X, et al. High stocking density alters growth performance, blood biochemistry, intestinal histology, and muscle quality of channel catfish *Ictalurus punctatus*[J]. Aquaculture, 2018, 492: 73-81.

Effects of stocking density on the antioxidant status, tissue structure, and *HSP70* and *Cu/Zn-SOD* expression in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in an in-pond raceway culture system

NI Jinjin¹, WANG Yuyu², XU Gangchun^{1,2}, NIE Zhijuan², LI Quanjie², XU Pao^{1,2}

1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China

Abstract: The in-pond raceway system (IPRS) combines the sustainable development of environmental protection and high yields. Compared with traditional pond culture, the IPRS can improve the survival rate, muscle nutrition, liver biological function, and antioxidant capacity of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). Stocking density is an important environmental factor in the in-pond raceway system, but the high density can cause stress responses in fish, which have negative impacts on growth, behavior, and physiology. Therefore, a suitable stocking density for largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in a recirculating aquaculture system needs to be identified. A 120-day feeding experiment was performed to study the effects of stocking densities on the antioxidant state, digestive enzymes, tissue structure, and the gene expressions of *HSP70* and *Cu/Zn-SOD* in largemouth bass (average initial body weight 4.50 ± 0.23 g) reared in in-pond raceway culture systems. The fish were divided into three density groups (SD1, 0.2 kg/m^3 ; SD2, 0.4 kg/m^3 ; and SD3, 0.6 kg/m^3). Each density was tested in triplicate. The relative indicators in the liver and intestine were measured, and the histological structures of the liver and intestine were observed at days 30, 60, 90, and 120. The results showed that the final densities at the end of the experiment were 5.64 kg/m^3 (SD1), 8.79 kg/m^3 (SD2), and 11.21 kg/m^3 (SD3). There were no significant difference in liver SOD and CAT activity among the treatments on days 30, 60, and 90 ($P > 0.05$). However, the fish reared in the SD1 group had significantly higher values than those reared in the SD3 group on day 120 ($P > 0.05$). There were no significant differences in the MDA contents of the livers before 60 d ($P > 0.05$), but fish reared in the SD3 group had significantly higher values than those reared in the SD1 group on days 90 and 120 ($P > 0.05$). The amylase and lipase activities in the intestines of the fish reared at the three groups were not significantly different ($P > 0.05$). Furthermore, there were no significant differences in *HSP70* and *Cu/Zn-SOD* expression in the livers among the three groups at 30–60 d ($P > 0.05$). The expression of *HSP70* in the livers of the fish from SD3 was significantly higher than those from the SD1 and SD2 groups at 90 d and 120 d ($P > 0.05$). However, the expression of *Cu/Zn-SOD* mRNA in the livers of the fish in SD1 was significantly higher than that in SD3 at 90–120 d ($P > 0.05$). The tissue section observations showed that the liver and intestinal tissues of the three density groups were normal and not seriously damaged, whereas the stress caused by the high stocking density led to a slight increase in vacuoles among the liver tissues and a decrease in the size and number of intestinal goblet cells at the end of the experiment. The results showed that the stress caused by the high stocking density inhibited the antioxidant capacity of largemouth bass and affected the expression of the *HSP70* and *Cu/Zn-SOD* genes in the liver. It also had a slight effect on liver and intestinal structure. In conclusion, the stocking density affected the physiological status of largemouth bass and inhibited the antioxidant and immune functions of the fish. Moreover, the high-density stress caused slight damage to the liver and intestinal tissues under the conditions of this experiment. In summary, the largemouth bass reared in the 0.2 kg/m^3 density group had the best physiological status. Overall, the results suggest that largemouth bass can be reared at stocking densities of $0.2\text{--}0.4 \text{ kg/m}^3$ in an IPRS.

Key words: *Micropterus salmoides*; stocking density; in-pond raceway system (IPRS); antioxidant status; tissue structure; *HSP70*; *Cu/Zn-SOD*

Corresponding author: XU Pao. E-mail: xup@ffrc.cn