

正交试验法优选菲牛蛭饲料配方研究

李 军^{1,2}, 于 翔^{1,2*}, 龚 元³, 张 涛^{1,2}, 张 健^{1,2}, 宋文华^{1,2}

1. 辽宁省淡水水产科学研究院, 辽宁 辽阳 111000

2. 辽宁省水生动物病害防治重点实验室, 辽宁 辽阳 111000

3. 荆州市民康生物科技有限公司, 湖北 荆州 434300

摘 要: 目的 优化菲牛蛭 *Poecilobdella manillensis* 的人工饲料 3 种主要成分配比, 确定饲料的最佳配方。方法 采用湿土网箱法养殖菲牛蛭, 以存活率和个体体质量增长率为考察指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法, 考察血球蛋白粉 (NP-90)、血浆蛋白粉 (NP-2002) 和维生素 C (VC) 3 个因素, 优选菲牛蛭人工饲料。采用层次分析法统计正交试验, 分析各因素各水平对试验结果的影响权重。结果 以菲牛蛭存活率为考察指标时, 3 种因素对成活率的影响为 $VC > NP-90 > NP-2002$, 以 0 NP-90、1% NP-2002 和 0.05% VC 组合为最佳; 以菲牛蛭个体体质量增长率为考察指标时, 3 种因素对个体体质量增长率的影响大小依次为 $NP-2002 > NP-90 > VC$, 饲料配方以 0.5% NP-90、3% NP-2002 和 0.05% VC 组合为最优。层次分析表明, 各因素对正交试验的指标值影响的主次顺序为 $NP-90 > NP-2002 > VC$, 0.5% NP-90、3% NP-2002 和 0.05% VC 的权重最大, 正交试验的最优方案为 0.5% NP-90、3% NP-2002 和 0.05% VC。按 0.5% NP-90、3% NP-2002 和 0.05% VC 及其他成分配制饲料喂菲牛蛭, 进行验证试验, 结果饲料组菲牛蛭成活率达 100%, 个体体质量增长率达 19.91%。结论 按 0.5% NP-90、3% NP-2002 和 0.05% VC 及其他成分配制饲料可作为菲牛蛭人工饲料。

关键词: 菲牛蛭; 人工饲料; 正交试验; 湿土网箱法; 存活率; 层次分析法; 血球蛋白粉; 血浆蛋白粉; 维生素 C

中图分类号: R282.3 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)06-0782-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.06.008

Optimization of formula of artificial diets for *Poecilobdella manillensis* by orthogonal test

LI Jun^{1,2}, YU Xiang^{1,2}, GONG Yuan³, ZHANG Tao^{1,2}, ZHANG Jian^{1,2}, SONG Wen-hua^{1,2}

1. Liaoning Institute of Freshwater Fisheries Sciences, Liaoyang 111000, China

2. Liaoning Key Laboratory of Aquatic Animal Infectious Diseases Control and Prevention, Liaoyang 111000, China

3. Jingzhou Minkang Biotechnology Co., Ltd., Jingzhou 434300, China

Abstract: **Objective** To optimize the formula of artificial diets for *Poecilobdella manillensis*. **Methods** Survival rate and individual body weight growth rate of *P. manillensis* were chosen as indexes. The three factors [NP-90 spray-dried hemoglobin powder, NP-2002 spray-dried plasma powder, and vitamin C (VC)] of the formula of artificial diets were investigated by $L_9(3^4)$ orthogonal test. AHP was applied to statistical analysis on non-interacting orthogonal test, the effect weight of each factor for test result was obtained, and principal-secondary sequence of factors and optimal project was given. **Results** The effects of the three components in artificial diets on the survival rate were in the following decreasing order: $VC > NP-90 > NP-2002$. And the optimization of components of artificial diets was 0 NP-90 spray-dried hemoglobin powder, 1% NP-2002 spray-dried plasma powder, and 0.05% VC. When the individual body weight growth rate was chosen as the index, the effects of the three components in artificial diets on the individual body weight growth rate were in the following decreasing order: $NP-2002 > NP-90 > VC$. The optimization of components of artificial diets was 0.5% NP-90 spray-dried hemoglobin powder, 3% NP-2002 spray-dried plasma powder, and 0.05% VC. The weight of principal-secondary sequence of factors and levels influences on the tests' results was $NP-90 > NP-2002 > VC$. The weight of 0.5% NP-90 spray-dried hemoglobin powder, 3% NP-2002 spray-dried plasma powder and 0.05% VC was maximum.

收稿日期: 2013-10-20

基金项目: 辽宁省海洋与渔业厅“吸血水蛭工厂化高密度养殖技术研究”项目 (200903)

作者简介: 李 军 (1975—), 男, 工程师, 主要从事水产种质资源研究。E-mail: lj_nwafu@163.com

*通信作者 于 翔, 教授级高级工程师。E-mail: yulunly@126.com

And the optimization of components in artificial diets was 0.5% NP-90 spray-dried hemoglobin powder, 3% NP-2002 spray-dried plasma powder, and 0.05% VC. According to the results, *P. manillensis* bred with the artificial diets (0.5% NP-90 spray-dried hemoglobin powder, 3% NP-2002 spray-dried plasma powder, 3% NP-2002 spray-dried plasma powder, 0.05% VC, and other components) had the survival rate of 100% and the individual body weight growth rate was 19.91%. **Conclusion** The optimal artificial diets could be used to feed *P. manillensis*.

Key words: *Poecilobdella manillensis* Lesson; artificial diets; orthogonal test; cage culture with moist earth; survival rate; analytic hierarchy process; NP-90 spray-dried hemoglobin powder; NP-2002 spray-dried plasma powder; vitamin C

菲牛蛭 *Poecilobdella manillensis* Lesson 是吸血类水蛭的一种, 俗名金边蚂蟥、马尼拉医蛭, 隶属环节动物门 (Annelida) 蛭纲 (Hirudinea) 无吻蛭目 (Arhynchobdellida) 医蛭科 (Hirudinidae) 牛蛭属 *Poecilobdella* Whitman, 主要分布于亚洲东南部, 在我国主要分布在福建、台湾、广东、广西和海南等省^[1], 资源相对丰富。菲牛蛭具有多种活性成分, 如菲牛蛭素^[2-4]、纤维蛋白溶解酶、抗血小板聚集成成分和抑菌成分等^[5], 具有抗凝血、抗血栓^[6]、抗血小板聚集^[7]等多种药理作用, 是重要的中药水蛭品种。目前, 由于医学临床、中药和其他科学研究的应用, 需求逐年加大, 其价格逐年升高, 采捕量不断增加, 同时由于近年来人类活动的影响, 菲牛蛭的栖息地不断缩小, 野生资源破坏严重, 导致其种群数量不断减少, 自然资源日益减少, 而高价格又驱使过度采捕, 形成恶性循环。为了可持续利用这一物种, 我国学者对其生长^[8]、养殖^[9-10]、繁殖^[11]和生存环境^[12]进行了深入的研究, 但在菲牛蛭养殖过程中, 还是饲喂哺乳动物的新鲜血液, 新鲜血液具有产量小、质量不稳定、易污染、易腐败以及不易运输和储存等缺点, 不适合规模化养殖。所以饲料环节已成为菲牛蛭产业化养殖的主要制约因子之一。为解决菲牛蛭养殖中饲料问题, 本研究在预试验基础上, 以血球蛋白粉 (NP-90)、血浆蛋白粉 (NP-2002) 和维生素 C (VC) 3 种主要成分为不同因素, 以不同的添加剂量为水平因素, 进行正交试验, 确定饲养菲牛蛭最佳饲料配方, 为菲牛蛭规模化养殖提供参考数据。

1 仪器与材料

YP10002 型电子天平 (上海光正医疗仪器有限公司)、Direct—Q5 纯水机 (Millipore)、X47 塑料箱 (威海市都程塑料有限公司)。

饥饿健康菲牛蛭成年蛭, 其平均体质量 ≥ 2.0 g, 由荆州市民康生物科技有限公司提供。

NP-90、NP-2002 (长春索纳克生物科技有限公司), 复合维生素预混合饲料 (郑州福源动物药业有

限公司), 氯化钠 (沈阳市华东试剂厂), *L*-精氨酸 (国药集团化学试剂有限公司), 蛋白酶 (广州市暨生元生物科技有限公司), VC (东北制药集团股份有限公司)。

2 方法与结果

2.1 菲牛蛭养殖管理

菲牛蛭养殖采用室内湿土网箱法^[9], 养殖密度为 40 尾/箱。饲料配制后, 灌制猪大肠后直接投喂, 养殖周期为 30 d (2013 年 7~8 月), 投喂频率为每 5 天 1 次。试验中注意观察菲牛蛭饱食后状态。

实验期间, 保持生态室安静, 通风良好, 每天观察菲牛蛭存活情况, 挑出病、死蛭, 保持清洁的养殖环境及一定的湿度 (各试验组换土、淋水量及次数一致), 水源为曝气 3 d 的自来水。

2.2 正交试验设计与结果

2.2.1 因素水平确定 在预试验的基础上, 选取影响菲牛蛭生长和存活的 3 种主要饲料成分, 即 NP-90、NP-2002 和 VC 为考察因素, 以成活率和体质量增长率为评价指标, 采用 3 因素 3 水平, 即正交试验法优选菲牛蛭饲料配方 (饲料配方: NP-90 0、0.5%、1%, NP-2002 1%、2%、3%, 复合维生素预混合饲料 0.2 g, 氯化钠 17.53 g, 精氨酸 0.35 g, 蛋白酶用量为 NP-90 用量的 0.1%, VC 0.05%、0.10%、0.15%, 加纯水至 2 000 mL。实验因素水平见表 1), 确定 NP-90 (A)、NP-2002 (B) 和 VC (C) 最佳用量。

2.2.2 数据的统计和分析 实验开始前, 选取菲牛蛭 30 尾, 称量个体体质量 (精确到 0.01 g), 计算平均个体体质量, 称量前用润湿的纱布除去亲蛭体表附着的脏物 and 水分。实验分组后, 测定每箱菲牛蛭的总质量。在实验结束后, 按实验分组分别统计存活尾数及存活菲牛蛭总质量, 计算实验组成活率总和 (Y_1)、实验组成活率的标准误差 (D_1) 以及实验组个体体质量增长率总和 (Y_2)、实验组个体体质量增长率标准误差 (D_2), 进行重复试验方差分析, 采用层次分析法统计正交试验结果, 确定 NP-90、

NP-2002 和 VC 最佳用量。

$$\text{体质量增长率} = (W_2 - W_1) / W_1$$

$$\text{成活率} = S_2 / S_1$$

W_1 为实验开始时菲牛蛭的平均个体体质量, W_2 为实验结束时菲牛蛭的平均个体体质量, S_1 为实验开始时菲牛蛭的尾数, S_2 为实验结束时菲牛蛭的尾数

2.2.3 正交试验结果 正交试验结果见表 1。3 种饲料成分对菲牛蛭存活率的极差 (R) 值最大为 C 因素, 其次分别为 A 因素和 B 因素, 分别为 63.33、48.33 和 29.17, 由此得出, 饲料成分中 VC 用量是影响菲牛蛭存活率的主要因素, 其次为 NP-90 和 NP-2002。方差分析结果表明 (表 2), 区组间和处理间均无显著差异 ($P > 0.05$), 3 种饲料成分中, C 因素呈显著性差异 ($P < 0.05$), A 因素和 B 因素对菲牛蛭存活率则无差异 ($P > 0.05$), 菲牛蛭的饲料配方以 $A_1B_1C_1$ 组合为最佳。

以菲牛蛭体质量增长率为考察指标时, R 值大小依次为 $B > A > C$, 3 种饲料成分中 B 因素对菲牛蛭体质量增长率影响最大, 方差分析结果表明 (表 2), 区组间无显著差异 ($P > 0.05$), 处理间有显著差异 ($P < 0.05$), A、B 和 C 3 个因素中均显示有显著差异 ($P < 0.05$), 饲料配方以 $A_2B_3C_1$ 组合为最佳。

表 1 菲牛蛭人工饲料正交试验测定结果

Table 1 Results of orthogonal test for artificial diets for *P. manillensis*

试验号	A/%	B/%	C/%	Y_1 /%	D_1	Y_2 /%	D_2
1	1 (3)	3 (3)	0.05 (1)	87.50	21.25	41.88	13.57
2	0 (1)	2 (2)	0.15 (3)	127.50	13.75	-41.71	1.33
3	1 (3)	1 (1)	0.15 (3)	97.50	16.25	-26.15	13.62
4	0 (1)	3 (3)	0.10 (2)	90.00	12.50	35.07	17.90
5	0.5 (2)	3 (3)	0.15 (3)	87.50	11.25	33.42	5.52
6	1 (3)	2 (2)	0.10 (2)	55.00	5.00	-9.66	4.47
7	0.5 (2)	2 (2)	0.05 (1)	167.50	3.75	63.55	3.53
8	0.5 (2)	1 (1)	0.10 (2)	87.50	1.25	-1.43	0.49
9	0 (1)	1 (1)	0.05 (1)	167.50	16.25	-20.09	1.90
k_1	128.33	117.50	140.83				
k_2	114.17	116.67	77.50				
k_3	80.00	88.33	104.17				
R_k	48.33	29.17	63.33				
j_1	-8.91	-15.89	28.45				
j_2	31.85	4.06	7.99				
j_3	2.02	36.79	-11.48				
R_j	40.76	52.68	39.93				

表 2 菲牛蛭存活率和个体体质量增长率方差分析结果

Table 2 Analysis of variance of survival rate and individual body weight growth rate of *P. manillensis*

误差来源	自由度	Y_1		Y_2		$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
		离差平方和	F 值	离差平方和	F 值		
区组间	1	378.13	1.16	524.88	4.23	5.32	11.62
处理间	8	5 981.25	2.29	5 219.43	5.26	3.44	6.03
A	2	1 852.08	2.84	1 335.04	5.39	4.46	8.65
B	2	827.08	1.27	2 122.22	8.56	4.46	8.65
C	2	3 033.33	4.66	1 195.84	4.82	4.46	8.65
误差	8	2 606.25		991.53			
总变异	17	8 965.63		6 735.83			

2.2.4 各因素各水平对试验结果影响权重 采用层次分析法^[13]统计分析正交试验结果, 得出各因素各水平对试验结果的影响权重, 从而确定因素的主次顺序及最佳条件。计算得出各个因素各水平对正交试验的指标值影响的权重分别为 A_1 0.029 7、 A_2 0.269 9、 A_3 0.064 9、 B_1 -0.079 2、 B_2 0.078 3、 B_3 0.326 1、 C_1 0.204 2、 C_2 0.086 5、 C_3 -0.017 0, 其中各因素对正交试验的指标值影响的主次顺序为 $A > B > C$, 其中 A_2 、 B_3 和 C_1 的权重最大, 正交试验的最优方案为 $A_2B_3C_1$, 即饲料配方中 3 种成分以 0.5% NP-90、3% NP-2002 和 0.05% VC 组合为最优。

2.3 验证试验

按 $A_2B_3C_1$ 配方配制人工饲料饲喂菲牛蛭, 同时以牛血为对照, 养殖周期为 30 d, 投喂频率为每 5 天 1 次, 进行验证试验。结果见表 3。人工饲料组成活率达 100%, 个体体质量增长率达 19.91%, 而对照组成活率仅为 75%, 明显低于人工饲料组成活率 (100%), 而其个体体质量增长率却达到 184.24%, 远远高于饲料组个体体质量增长率 (19.91%)。在投喂人工饲料时, 菲牛蛭摄食状态正常, 其摄食率与投喂血液组摄食率基本一致, 达 30%~50%, 在饲食后菲牛蛭饱食程度和状态也与摄食血液组相同。

3 讨论

近年研究表明, 菲牛蛭具有生长快^[9], 苗种易获得^[11]以及对环境适应性强^[10]等良好的生产性能, 但菲牛蛭采食具有特殊性, 其食料范围窄、营养要求高, 所以至今还没适合的饲料, 饲料环节是菲牛蛭养殖中关键因素之一, 制约其养殖规模和范围^[14]。由于天然饲料存在种种弊端, 其已远远不能满足菲

表 3 菲牛蛭饲喂最佳人工饲料实验结果
Table 3 Result of *P. manillensis* fed with optimal artificial diets

组别	日期	平均个体质量 / g	尾数	个体体质量增长率 / %	存活率 / %
饲料实验组	2013-07-11	4.52	40	—	—
	2013-08-10	5.42	40	19.91	100
对照组	2013-07-11	4.76	40	—	—
	2013-08-10	13.53	30	184.24	75

牛蛭养殖发展的需求,所以有必要开发菲牛蛭的人工饲料。本研究中,人工饲料的主要成分 NP-90 和 NP-2002 是一种新开发的动物性饲料蛋白源,蛋白质丰富,已在养殖业中广泛应用^[15-16],将二者按比例配制,其营养成分与血液相近^[17],所以本研究中人工饲料以 NP-90 和 NP-2002 为主要成分,同时添加复合维生素预混合饲料、氯化钠、精氨酸、蛋白酶和 VC 以增加诱食性和补充必要的维生素,其中 VC 对水生动物生长、繁殖及免疫具有重要的生理作用^[18]。综合考虑不同成分的不同作用,以 NP-90、NP-2002 和 VC 为不同因素,以不同的添加剂量为水平因素设计正交试验,采用层次分析法统计分析,按 0.5% NP-90、3% NP-2002 和 0.05% VC 配方配制饲料,验证结果表明,饲料试验组成活率达 100%,个体体质量增长率达 19.91%,其成活率高于对照组(75%),而个体体质量增长率却远远低于对照组(184.24%),这主要与新鲜血液和配合饲料成分差别有关,血液中含有大量的血球,菲牛蛭吸食血液后,由于特殊的消化机制,血球在其体内保存完好,供其长时间消化吸收;而配合饲料中 NP-90 的血球在加工生产中已破碎,虽然营养成分与血液相近,但存在形式不相同,从而造成个体体质量增长率的不同。在菲牛蛭养殖中,成活率是一项关键指标,保证高成活率的基础上,增加菲牛蛭的体质量,能显著提高经济效益。所以在今后配合饲料研制中,要深入研究菲牛蛭的消化吸收血液的机制,改进人工饲料配方。

由以上结论可得出,按 0.5% NP-90、3% NP-2002、0.05% VC 及其他成分配制饲料,可以作为菲牛蛭饲料,具有成本低、可批量生产、易保存、质量稳定以及安全系数高等优点。

参考文献

[1] 杨 潼. 中国动物志—蛭纲 [M]. 北京: 科学出版社, 1996.
[2] Steiner V. Primary structure and function of novel oglycosylated hirudins from the leech *Hirudinaria*

manillensis [J]. *Biochemistry*, 1992, 31: 2294-2298.

[3] Scacheri E. Novel hirudin variants from the leech *Hirudinaria manillensis*, amino acid sequence, cDNA cloning and genomic organization [J]. *Eur J Biochem*, 1993, 214(1): 295-304.
[4] 黄爱民, 黎肇炎, 廖共山, 等. 广西菲牛蛭消化液中抗凝物质的分离纯化 [J]. 中国生化药物杂志, 2006, 27(5): 273-276.
[5] 黎渊弘, 黎肇炎. 我国菲牛蛭的研究概况 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(11): 2716-2718.
[6] 吴志军, 于立华. 菲牛蛭及其制品的抗血栓、溶血栓作用 [J]. 中成药, 2007, 29(4): 591-593.
[7] 李 文, 廖福龙, 殷晓杰, 等. 七种水蛭抗血小板聚集与抗凝血研究 [J]. 中药药理与临床, 1997, 13(5): 32-34.
[8] 谭恩光, 黄立英, 关 莹, 等. 广东菲牛蛭生长和生殖的研究 [J]. 中草药, 2002, 33(9): 837-840.
[9] 于 翔. 菲牛蛭室内高密度养殖技术研究 [D]. 广州: 中山大学, 2009.
[10] 周维官, 周维海, 覃国森. 菲牛蛭的人工养殖方式试验 [J]. 广西科学, 2008, 15(3): 317-320.
[11] 张 彬, 于 翔, 汪 波, 等. 菲牛蛭交配及卵茧人工孵化初步研究 [J]. 动物学杂志, 2011, 46(4): 78-83.
[12] 谭恩光. 广东菲牛蛭生活水体的化学环境 [J]. 中草药, 2005, 36(10): 1561-1563.
[13] 郭穗勋, 黄榕波. 正交试验层次分析法 [J]. 大学数学, 2004, 20(1): 114-117.
[14] 王 武. 鱼类增养殖学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
[15] 张丽英, 王燕华, 李德发. 血浆蛋白粉在仔猪饲料中的应用 [J]. 中国饲料, 2000(9): 25-27.
[16] Guk H B, Kwon S K. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) skin [J]. *Process Biochem*, 2001, 36(12): 1155-1162.
[17] 黄百花, 杨朝旭, 张玉民, 等. 血浆蛋白粉、血球蛋白粉及血粉三者之间的差异 [J]. 饲料博览, 2012(6): 14-16.
[18] 胡俊茹, 王安利, 曹俊明, 等. 维生素 C 对水生动物生长、繁殖及免疫的调节作用 [J]. 水产科学, 2009, 28(1): 40-46.