

蒜头藻脂肪酸在河蟹育苗过程中的传递

唐晟凯, 王庆, 杨家新

(南京师范大学生命科学学院水产研究所, 江苏 南京 210097)

[摘要] 采用经蒜头藻(*Monodus subterraneus*)强化的褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*, 以下简称轮虫)投喂中华绒螯蟹(俗称河蟹)溞状幼体, 并对不同密度轮虫的投喂效果以及蒜头藻中的二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)等高度不饱和脂肪酸(HUFA)在育苗过程中的传递进行了探讨. 结果显示: 轮虫经 72 h 强化, EPA、DHA 含量达到最高值, 从 0 分别提高到 7.82% 和 1.80%. 以幼体的变态率和存活率为评判指标, 发现在溞状Ⅱ期, 轮虫最适投喂密度为 20 ind/mL; 在溞状Ⅲ期, 轮虫最适投喂密度为 30 ind/mL. 由强化轮虫喂养得到的 Z₄ 的 EPA、DHA 含量分别是 12.76%、5.61%, 显著高于由未强化轮虫喂养得到的 Z₄. 表明蒜头藻的脂肪酸, 特别是 EPA、DHA 在育苗过程中能通过食物链有效地传递给溞状幼体.

[关键词] 蒜头藻, 轮虫, 中华绒螯蟹, 幼体, EPA, DHA

[中图分类号] S963.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2006)01-0098-04

The Transfer of Fatty Acids of *Monodus Subterraneus* During the *Eriocheir Sinensis* Larvae Breeding Process

Tang Shengkai, Wang Qing, Yang Jiaxin

(Institute of Aquatic Products, School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: The effects of rotifer, *Brachionus plicatilis*, on the development and survival of Chinese mitten-hand crab larvae, and the transfer of highly unsaturated fatty acids (HUFA), mainly eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), are studied during the larval developmental stages. The results show that after 72 h, the percentage of EPA and DHA in the rotifer fed with *Monodus subterraneus* reach the highest values, 7.82% and 1.80% respectively. The highest ecdysis and survival rate of Z₂ and Z₃ are gained by feeding the rotifers at 20 ind/mL and 30 ind/mL respectively. The percentage content of EPA and DHA in the Z₄ fed with the enriched rotifers are significantly higher than that fed with un-enriched rotifers, reach 12.76% and 5.61% respectively. The results suggest that HUFA, mainly EPA and DHA, in the *Monodus subterraneus* can be transferred effectively to the larvae during the breeding process.

Key words: *Monodus subterraneus*, rotifer, *Eriocheir sinensis*, larvae, EPA, DHA

0 引言

EPA、DHA 作为蟹类幼体的必需脂肪酸, 对于幼体正常生长、发育、脱壳和存活起重要的促进作用^[1-2], 因此, 在幼体的饵料中添加 EPA、DHA 等 HUFA 就成为了提高蟹苗质量和产量的关键因素. 轮虫是河蟹育苗中重要的开口饵料, 但其自身不能合成 EPA、DHA 等 HUFA, 因此其体内 EPA、DHA 含量偏低, 远不能满足蟹类幼体正常生长和发育的需要. 而很多种类的微藻能自身合成 EPA 和 DHA 等多种 HUFA,

收稿日期: 2005-03-02.

基金项目: 江苏省水产三项更新工程资助项目(PJ2002-31; PJ2003-33).

作者简介: 唐晟凯, 1981—, 硕士研究生, 主要从事水产养殖学、浮游动物学的学习与研究. E-mail: lucktsk@sohu.com

通讯联系人: 杨家新, 教授, 主要从事水产养殖学的教学与研究. E-mail: jiaxiny@public1.ptt.js.cn

国内外都对此做了大量研究^[3-5].通过食物链作用,把微藻中的脂肪酸通过轮虫传递给蟹类幼体,成为提供蟹类幼体中 EPA、DHA 等 HUFA 的有效途径.国外许多研究者对从蒜头藻中提取 EPA 作过了大量研究^[6,7].本实验即选用该藻,连续测定并分析 EPA、DHA 等 HUFA 在食物链:蒜头藻→轮虫→溞状幼体中的传递状况,以期为河蟹育苗生产提供参考.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 藻种及其培养

蒜头藻,从以色列引进,本为淡水藻种.本实验室采用逐步加盐的方法,最终使总盐浓度达到 20‰,以此驯化蒜头藻,然后用 1/2 培养基培养再驯化后培养的蒜头藻(以下称为海水蒜头藻).

1.1.2 褶皱臂尾轮虫

采自赣榆县海州湾的自然海区,经分离多代培养后备用.

1.1.3 中华绒螯蟹溞状幼体

同批实验用的溞状幼体由同一个抱卵蟹孵化而来.

1.1.4 酵母

奥力牌高活性干酵母,由珠海奥力酵母有限公司生产.

1.2 方法

1.2.1 轮虫的培养和强化

采用 40 L 的玻璃瓶进行轮虫的酵母培养(酵母的投喂量为 $1.0 \text{ g/d} \cdot 100$ 万轮虫),然后在 20 L 的玻璃瓶里进行营养强化培养,轮虫密度为 $300 \sim 400 \text{ ind/mL}$,共设置 5 个 20 L 的玻璃瓶. A 瓶中的轮虫继续用酵母培养, B、C、D、E 瓶用相同浓度的海水蒜头藻强化,分别强化 12 h、1 d、3 d、7 d 后收获.营养强化过程中,需要检测并及时补充藻液,使水体中的藻细胞始终保持在设计密度水平,海水蒜头藻的密度设计在 $3 \times 10^6 \text{ ind/mL} \sim 4 \times 10^6 \text{ ind/mL}$.所得 5 组轮虫做脂肪酸组成的检测.

1.2.2 溞状幼体的培养

用经蒜头藻强化 3 d 后所得的轮虫投喂溞状幼体,投喂密度分别设计为 5、10、20、30、40、50、60 ind/mL,实验分 7 组,每个处理组都使用容积为 20 L 的玻璃瓶装 10 L 的过滤海水,每个处理组放 Z_2 (或 Z_3) 100 只,盐度为 $20 \pm 1.0\text{‰}$,温度 $20 \pm 0.2^\circ\text{C}$,连续充气,96 h 后检查每个处理组里存活和已经变态的幼体数,并计算变态率和存活率.每隔 12 h 检查轮虫的密度,并及时调整到设置水平.每组设置 5 个重复.

1.2.3 微藻、轮虫和溞状幼体(Z_4)的收获及保存

微藻采用离心法收获,并冷冻干燥.轮虫采用 200 目的筛绢过滤收获,冷冻干燥.待测脂肪酸含量的溞状幼体(Z_4)采用 125 目的筛绢过滤收获,并冷冻干燥.

1.2.4 脂肪酸分析

所有待检测样品送农业部油料及制品质量监督检验测试中心检测.仪器为美国惠普公司 HP5890 plus 气相色谱仪, FID 检测器检测,按 Volkman 的方法将脂肪酸甲酯化,色谱条件:柱温 180°C ,进样温度 220°C ,检测器温度 240°C .

1.2.5 数据的计算与处理

变态率 = 检查时已经蜕皮变态的存活幼体数 / 实验开始放入的幼体数 $\times 100\%$

存活率 = 检查时的全部存活幼体数 / 实验开始放入的幼体数 $\times 100\%$

2 结果与分析

2.1 海水蒜头藻及其强化的轮虫的脂肪酸组成的测定与分析

对海水蒜头藻及其强化的轮虫的脂肪酸组成进行测定与分析,结果如表 1 所示.从表 1 可以看出,海水蒜头藻的 EPA、DHA 含量比较高,分别达到 10.51% 和 2.23%.轮虫经强化,其体内的 EPA、DHA 含量在 3d 时达到最大值,分别为 7.82% 和 1.80%.过短的强化时间(24 h 内)和过长的强化时间(7 d)都会使轮虫的 EPA、DHA 含量产生较大波动,从而不能达到理想的强化效果.酵母轮虫中不含有 EPA 和 DHA.

表 1 海水蒜头藻及其强化轮虫的脂肪酸组成/%

	蒜头藻	12 h 轮虫	1 d 轮虫	3 d 轮虫	7 d 轮虫	酵母轮虫
豆蔻酸	2.67	1.42	0.50	2.22	1.13	2.35
豆蔻烷酸	0.42	0.30	0.15	0.70	1.22	2.02
十五碳烷酸	0.92	0.68	0.33	1.22	0.94	1.16
棕榈酸	17.40	11.98	8.86	17.04	18.30	15.39
棕榈烯酸	8.66	5.81	2.83	9.62	8.07	13.83
棕榈二烯酸	0.77	0.22	0.16	0.85	0.52	0.35
棕榈三烯酸	2.58	0.17	—	—	—	1.24
硬脂酸	7.74	3.91	2.58	5.83	4.00	6.22
油酸	18.54	41.71	51.55	22.86	34.70	30.60
亚油酸	5.68	13.83	16.48	8.22	10.82	7.02
亚麻酸	18.64	6.39	7.80	8.14	12.99	3.96
花生酸	2.88	—	0.56	6.42	2.02	7.93
花生烯酸	0.30	4.14	2.38	1.40	0.56	—
花生二烯酸	—	—	—	—	—	1.52
花生四烯酸	0.02	0.92	0.18	1.88	0.71	2.25
EPA	10.51	5.98	3.82	7.82	2.65	—
DHA	2.23	0.74	0.55	1.80	0.52	—
其他	—	1.75	1.27	3.96	—	4.16

2.2 Z₂ 在不同轮虫密度组中的平均变态率和平均存活率

将 Z₂ 放入不同的轮虫密度处理组中,经 96 h 后统计出 7 个实验组 Z₂ 的平均变态率和平均存活率,结果见表 2. 可以看出:当轮虫密度低于 20 ind/mL 时,Z₂ 的变态率和存活率随着轮虫密度的升高而提高,当密度为 20 ind/mL 时,变态率和存活率分别为 53.00% 和 57.20%,均为最大值. 当轮虫密度大于(或等于)30 ind/mL 时,Z₂ 的变态率和存活率随着轮虫密度的升高而下降,统计学分析显示:各组间的平均变态率和平均存活率差异均是显著的($p < 0.05$). 因此可得,在溞状Ⅱ期,投喂轮虫的最适密度是 20 ind/mL.

表 2 不同轮虫密度下 Z₂ 的变态率、存活率/%

轮虫密度/(ind/mL)	平均变态率	平均存活率
5	10.00 ± 0.71	11.00 ± 0.71
10	21.20 ± 0.97	22.20 ± 0.86
20	53.00 ± 1.00	57.20 ± 1.39
30	36.20 ± 2.41	40.00 ± 2.59
40	26.20 ± 1.37	29.00 ± 0.71
50	16.40 ± 0.93	17.60 ± 1.21
60	6.60 ± 0.51	7.6 ± 0.68

2.3 Z₃ 在不同轮虫密度组中的平均变态率和平均存活率

将 Z₃ 放入不同的轮虫密度处理组中,经 96 h 后统计出 7 个实验组 Z₃ 的平均变态率和平均存活率,结果见表 3. 可以看出,当轮虫密度低于 30 ind/mL 时,Z₃ 的变态率和存活率随着轮虫密度的升高而提高,当密度为 30 ind/mL 时,变态率和存活率分别为 54.00%、58.80%,均为最大值. 当轮虫密度大于(或等于)40 ind/mL 时,Z₃ 的变态率和存活率随着轮虫密度的升高而下降. 统计学分析显示:10 ind/mL 组与 50 ind/mL 组所得的 Z₃ 的变态率、存活率没有显著差异($p > 0.05$),其他各组之间的平均变态率和平均存活率差异均为显著($p < 0.05$). 因此可认为,在溞状Ⅲ期,投喂轮虫的最适密度是 30 ind/mL.

表 3 不同轮虫密度下 Z₃ 的变态率、存活率/%

轮虫密度(ind/mL)	平均变态率	平均存活率
5	9.20 ± 1.11	10.60 ± 1.29
10	14.00 ± 1.26	16.20 ± 1.66
20	32.20 ± 2.42	35.80 ± 2.82
30	54.00 ± 2.86	58.80 ± 2.62
40	23.00 ± 2.17	25.60 ± 2.01
50	12.40 ± 1.08	13.80 ± 1.07
60	4.20 ± 0.73	5.20 ± 0.97

2.4 蒜头藻强化的轮虫对 Z₄ 脂肪酸含量的影响

收集经蒜头藻→轮虫→溞状幼体喂养得到的 Z₄(溞状幼体 A)和酵母→轮虫→溞状幼体喂养得到的 Z₄(溞状幼体 B,作为对照),分别测定其脂肪酸含量,结果见表 4.

从表 4 可以看出,溞状幼体 A 和溞状幼体 B 相比,前者总的脂肪酸含量达到 2.63%,EPA、DHA 含量分别达到 12.76%、5.61%;而后者总的脂肪酸含量只有 0.84%,EPA、DHA 含量分别为 6.71%、1.38%. 总的看来,前者无论是总的脂肪酸含量还是 EPA、DHA 的含量都明显高于后者.

3 讨论与结论

3.1 蒜头藻作为轮虫强化剂的可行性

从表 1 可知,蒜头藻富含 EPA、DHA. 经过 3 d 的强化,轮虫的 EPA、DHA 含量较高;强化 24 h 内轮虫 EPA、DHA 含量的波动,可能是因轮虫短期内对环境改变不适应修改;强化 7 d 后轮虫 EPA、DHA 含量的急剧下降,可能是因经过较长时间的轮虫培养,水体中含有了过多的抑制轮虫生长发育的化学物质所致. 陆开宏等^[5]认为通常在实际生产中强化轮虫用的海水小球藻的 EPA 含量很少,不含有 DHA. 因此,从营养成分看,只要掌握好强化时间,蒜头藻适合作为轮虫的强化剂.

3.2 轮虫投喂密度对溞状幼体变态率和存活率的影响

由于在生产中, Z_2 和 Z_3 对轮虫需求量大,为此对这两个阶段的轮虫最适投喂密度进行了探讨. 结果表明,在投喂密度较低时, Z_2 与 Z_3 的变态率和存活率都随着轮虫密度的增加而提高,但轮虫密度达到最适投喂密度后,如果继续加大投喂密度,反而会使变态率和存活率下降. 原因可能是轮虫密度过低,满足不了溞状幼体对营养的需要,而过高密度的轮虫可能会与溞状幼体争夺生存空间,同时会向水体中释放抑制溞状幼体生长发育的化学物质. 本实验中, Z_2 和 Z_3 的最适投喂密度分别为 20 ind/mL 和 30 ind/mL. 之所以出现最适投喂密度不同的情况,可能因为 Z_3 比 Z_2 个体大,消耗的能量多,要求的食物量也增加了.

3.3 蒜头藻在河蟹育苗中的重要作用

实验结果说明了在蒜头藻→轮虫→溞状幼体这个食物链中,EPA、DHA 得到了有效的传递. 经蒜头藻强化的轮虫喂养得到 Z_4 的总脂肪酸含量也明显比对照组高. 鉴于 EPA、DHA 等 HUFA 对河蟹幼体生长发育的重要的促进作用,可以得出:蒜头藻→轮虫→溞状幼体途径养殖的溞状幼体的质量必定更好.

3.4 结论

由本实验可以看出蒜头藻富含 EPA、DHA,是一种优良的“轮虫强化剂”,它可以提高轮虫体内的 EPA、DHA 等 HUFA 的含量,而轮虫作为溞状幼体的开口饵料,可以最终提高溞状幼体的脂肪酸含量. 这有利于在生产中降低成本,减少环境污染,从而为中华绒螯蟹的健康养殖提供优质的苗种资源.

表 4 蒜头藻强化轮虫和酵母轮虫投喂所得的 Z_4 的脂肪酸组成比较/%

脂肪酸	溞状幼体 A	溞状幼体 B(对照)
豆蔻酸	1.64	1.04
豆蔻烷酸	0.82	0.77
十五碳烷酸	1.17	0.58
棕榈酸	13.85	14.32
棕榈烯酸	10.14	2.74
棕榈二烯酸	2.68	0.86
硬脂酸	5.39	5.13
油酸	20.39	14.33
亚油酸	5.26	24.38
亚麻酸	6.89	4.67
花生酸	1.91	15.28
花生烯酸	1.77	1.25
花生二烯酸	2.08	1.33
花生四烯酸	5.43	4.01
EPA	12.76	6.71
DHA	5.61	1.38
其他	2.21	1.22
脂肪酸总含量/%	2.63	0.84

备注:上表中的脂肪酸总含量(%)指脂肪酸总含量占所测成分的质量分数.

[参考文献]

[1] Sargent J, McEvoy L, Estevez A, et al. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions[J]. Aquaculture, 1999, 179(1/4):217—229.

[2] 江洪波,陈立侨,周忠良,等. 不同饵料对中华绒螯蟹幼体发育和存活的影响[J]. 水产学报,2000,24(5):442—447.

[3] Inna Khozin, Zvi Cohen. Differential response of microalgae to the substituted pyridazinone, sandoz 9785, reveal different pathways in the biosynthesis of eicosapentaenoic acid [J]. Phytochemistry,1996,42(4):1025—1029.

[4] 梁英,麦康森. 微藻 EPA 和 DHA 的研究现状及前景[J]. 水产学报,2000,24(3):289—296.

[5] 陆开宏,林霞. 13 种饵料微藻的脂肪酸组成特点及在河蟹育苗中的应用[J]. 宁波大学学报:理工版,2001,14(3):27—32.

[6] Lu Congming, Rao Krishna, David Hall. Production of eicosapentaenoic acid (EPA) in *Monodus subterraneus* grown in a helical tubular photobioreactor as affected by cell density and light intensity[J]. Applied Phycology,2001,13(1):517—522.

[7] El-Hassan Belarbi, Emilio Molina, Yusuf Chisti. A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil[J]. Process Biochemistry,2000,35(9):951—969.

[责任编辑:孙德泉]