

用富含 DHA 的裂殖壶菌对轮虫进行营养强化的研究

宋晓金¹, 张学成¹, 朱路英¹, 李荻尔²

(1. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003; 2. 青岛森森实业有限公司, 山东 青岛 266101)

摘要:裂殖壶菌 (*Schizochytrium limanum*) 是一种高 DHA 含量的海洋真菌, 本实验用裂殖壶菌对褶皱臂尾轮虫 (*Brachionus plicatilis*) 进行营养强化。结果表明: 3 个实验组强化后轮虫体内的 DHA/FA 值和 DHA 含量均显著提高, DHA/FA 值分别为 5.98%、10.21% 和 13.44%, 轮虫体内的 DHA 质量比分别为 4.42、7.85、8.14 mg/g, 并于 12 h 后达到最大值, 超过 12h 后轮虫体内的 DHA 质量比及 DHA/FA 值开始下降。对照组在实验过程中均未检出 DHA。各实验组的其他指标, 如轮虫密度也显著高于对照组, 并且实验组的怀卵率分别为 34.8%、46.5% 和 53.7%, 而对照组仅为 20.1%。

关键词:营养强化; DHA; 褶皱臂尾轮虫 (*Brachionus plicatilis*); 裂殖壶菌 (*Schizochytrium limanum*)

中图分类号: S963.21

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2007)12-0043-04

裂殖壶菌 (*Schizochytrium limanum*) 属于真菌中的卵囊菌纲 (Oomycetes), 破囊壶菌属 (*Thraustochytrium*)。营养体为单细胞, 直径 7~15 μ m, 无性繁殖由孢子囊产生游动孢子, 游动孢子具等长的双鞭毛。裂殖壶菌是 1996 年日本学者 Honda 等^[1,2] 从西太平洋红树林地区分离到的, 1998 年 Onal 等用裂殖壶菌干粉喂养贝类, 对其生长有明显的促进作用。2000 年 Davis 等用裂殖壶菌干粉作为饵料添加剂喂养牡蛎幼体, 结果其生长速度比未加此添加剂的增加 3.2%, 增产效果明显; 利用裂殖壶菌干粉作为饵料添加剂可满足受精卵发育期对多不饱和脂肪酸的需求。2001 年 Hammond 等^[3] 对从裂殖壶菌中提取的 DHA 进行了药理学及毒理学方面的研究, 用裂殖壶菌制备的干粉作为食品添加剂, 喂养小鼠、兔子, 均未见有任何毒副作用。

褶皱臂尾轮虫 (*Brachionus plicatilis*) 是一种海洋轮虫, 作为苗种生产的前期生物饵料已被广泛使用, 轮虫自身所含的营养对水产动物苗种的成活率、生长速率及抗逆、抗病能力有很大影响^[4~7]。中国应用酵母培养轮虫的较多, 这种轮虫因缺乏脂溶性维生素及 n-3 多价不饱和脂肪酸, 在用作前期生物饵料时会造成苗种的营养不良。n-3 系列多不饱和脂肪酸 (n-3PUFA) 是海水稚鱼维持正常生长所必需的, 研究表明, n-3PUFA 中的 DHA 对稚鱼的生长发育起着决定性的作用。当缺乏 DHA 时, 会引起营

养不良, 生长停滞, 严重的可导致死亡。这种现象在海水鱼类中尤为严重, 尤其是仔稚鱼阶段。如果海水仔鱼饲料中缺乏 DHA, 将导致仔鱼神经系统的发育不良, 还直接影响细胞膜的色素沉着。如果在仔鱼的开口饲料中提供充足的 DHA, 可提高仔鱼对环境变化的忍耐力, 影响发育中鱼大脑的质量和脂肪酸组成, 从而提高仔鱼的存活率^[8,9]。因此, 在水产养殖过程中适量投放富含 DHA 的生物饵料是增产增收的一个重要手段, 国内外开发出了许多营养强化剂, 如日本等国的乳化乌贼肝油、油脂酵母, 比利时 INVE 公司的 Super Selco, 美国、挪威等的粉末油脂, 还有国内研制的 50DE 微囊 DHA 营养强化饵料^[10~12]。

目前国内关于裂殖壶菌的研究报告不多, 也未进行应用开发, 只有几篇关于裂殖壶菌的综述和一份提交到 Genbank 的 18S rRNA 的基因序列, 尚未发现用裂殖壶菌强化轮虫的报道。本研究采用裂殖壶菌对轮虫进行营养强化, 并用强化后的轮虫对幼鱼进行投喂实验。

收稿日期: 2005-01-20; 修回日期: 2005-05-20

基金项目: 青岛市科技发展计划项目 (04-2-HH-76)

作者简介: 宋晓金 (1980-), 男, 河北唐山人, 硕士研究生, E-mail: sxjbb@tom.com; 张学成, 通讯作者, E-mail: xc-zhang@ouc.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 裂殖壶菌

裂殖壶菌由中国海洋大学生命学院微藻生物技术实验室提供。

1.1.2 轮虫

褶皱臂尾轮虫由中国海洋大学生命学院微藻生物技术实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 轮虫强化

实验于 2004 年 6 月在青岛市小麦岛黄海水产研究所麦岛渔业科学试验基地进行。轮虫培养于 2 m³ 玻璃钢水槽中,每个玻璃钢水槽中的水体为 1 m³,水温为 25 ℃,绿球藻细胞密度为 850 万个/mL,充分通气^[13-15]。实验分为 A,B,C,D 4 个组,A 组为对照组,只添加绿球藻,B,C,D 组为实验组,分别加入质量浓度为 20,50,80 mg/L 的裂殖壶菌,其他条件各组均一致,于 3,6,9,12,18 h 在解剖镜下观察检测轮虫的摄食、活力、密度、怀卵率等指标的情况,并用 300 目筛绢收集轮虫样品速冻、待测。

1.2.2 样品甲酯化方法

称量冷冻干燥的轮虫干粉 20 mg、内标 2 mg 加入试管内,加入 5 mL 饱和 KOH-CH₃OH 溶液,超声波破碎 4 min 之后 60 ℃ 水浴 30 min,再加入 5 mL 饱和 BF₃-CH₃OH 溶液 60 ℃ 水浴 30 min。水浴后向试管中加入 5 mL 正己烷萃取,取上层清液保存待用。

1.2.3 DHA 的测定

采用天美 GC7890 气相色谱仪,脂肪酸柱为 3 mm × 2 m,载气为高纯氮,设定程序升温为 170 ~ 230 ℃,170 ℃ 保持 1 min,然后每分钟升温 15 ℃ 至 230 ℃,230 ℃ 保持 23 min,氢火焰检测器温度为 260 ℃。恒流控制,氮气流量为 30 mL/min,氢气流量为 30 mL/min,空气流量为 400 mL/min。进样量为 1 μL。使用内标法计算 DHA 在轮虫体内的含量及在总脂肪酸中的比例。

2 结果

2.1 各实验组观察检测结果

轮虫强化实验分为 A,B,C,D 4 个组,其中 A 为对照组,只添加绿球藻,细胞密度约 850 万个/mL,B,C,D 3 组为实验组,强化时添加绿球藻和裂殖壶菌,绿球藻细胞密度约 850 万个/mL,裂殖壶菌的质量浓度分别为 20,50,80 mg/L。实验起始时,各个实验组的轮虫密度分别为 171,198,162,177 个/mL;怀卵率分别为 9.9%,9.0%,9.7%,9.2%。轮虫游动和摄食情况良好。强化后轮虫密度、怀卵率及活力情况如图 1 和图 2。

从图 1 和图 2 可以看出,经过一段时间的适应后(约 3 h),对照组轮虫的活力及摄食情况仅稍有加强,而实验组轮虫的活力和摄食状况明显加强,均呈活跃状态。实验结束时,实验组中各项指标均显著高于对照组。对照组 A 的轮虫密度由 171 个/mL 上升到 220 个/mL,增长率为 28.7%;B 组轮虫密度由最初的 198 个/mL 上升到 292 个/mL,增长率为 47.5%;C 组最终密度为 397 个/mL,D 组为 412 个/mL,增长幅度分别高达 145%和 132%,呈现爆炸式增长;各实验组的怀卵率分别为 32.6%,46.5%和 53.7%,均明显高于对照组的 25.3%。通过对实验各组轮虫密度、怀卵率、活力和摄食情况的观察,说明裂殖壶菌对轮虫的生长和繁殖均有良好的促进作用。

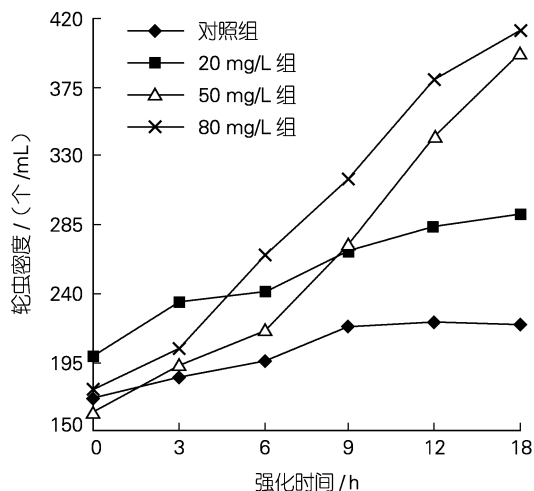


图 1 实验各组轮虫密度的变化

Fig. 1 Variation of rotifer density in every testing group

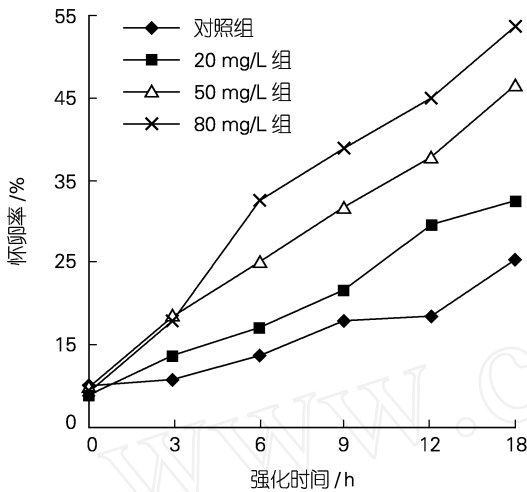


图2 实验各组轮虫怀卵率的变化

Fig.2 Variation of egg-hanging rate of rotifer in every testing group

表1 实验各组轮虫体内DHA的积累测定结果

Tab.1 Determination of DHA in rotifer body

组别	DHA (mg/ g)						DHA/ FA (%)					
	初始	3h	6h	9h	12h	18h	初始	3h	6h	9h	12h	18h
A	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-
B	0	0.67	1.38	4.01	4.42	3.99	-	2.47	3.86	4.73	5.98	5.16
C	0	3.5	5.04	6.51	7.85	5.45	-	2.61	4.86	8.43	10.21	10.74
D	0	3.5	5.31	6.87	8.14	5.73	-	3.53	7.54	10.02	13.44	12.53

注: -表示未检出

从表1可知,裂殖壶菌对增加轮虫体内的DHA含量有显著作用。3个实验组B,C,D在强化12h后轮虫体内DHA/FA的比值分别为5.98%,10.21%和13.44%,干燥轮虫粉中DHA的质量比分别为4.42,7.85,8.14 mg/g。在超过12h后,轮虫体内的DHA含量显著下降,因此,使轮虫体内积累高DHA含量的时间以12h为宜。对照组A在整个实验过程中均未检测出轮虫体内的DHA含量。

3 讨论

3.1 裂殖壶菌对轮虫生长率的影响

实验结束时,对照组A轮虫密度为220个/mL,增长了28.7%,实验组B轮虫密度为292个/mL,增长47.5%,而实验组C,D轮虫密度分别增长了145%和132%,达到了397个/mL和412个/mL。这是因为在C,D两组中,饵料营养丰富,环境条件适宜,在经过几个小时适应后,摄食活动加强,轮虫密度迅速增加。另外,C,D两组轮虫的怀卵率也很高,分别为46.5%和53.7%,保证种群能够持续稳定地存

2.2 实验各组轮虫体内DHA积累情况

将样品甲酯化后进行高压气相色谱分析,采用内标法,将内标直接加到溶液中,连同菌粉样品一起经历预处理全过程。这样,即使在预处理过程中试样部分损失或甲酯化反应中脂肪酸甲酯的转化率达不到100%也不影响定量结果。内标物质要求其色谱峰能够与其他试样组分峰分开完全,但又须和试样组性质相似,能经历样品预处理的全过程,试样本身不含内标物质或含量甚微^[16,17]。海洋微藻中正十九酸含量甚微,因此本方法选择正十九酸作内标。计算DHA的含量,并计算出轮虫体内的DHA/FA值和DHA的净含量,结果见表1。

在,能够满足工业化的连续生产。实验组B中由于裂殖壶菌的含量较低仅为20 mg/L,故B组轮虫的增长速率和轮虫的怀卵率都不高,强化效果不佳。此外,由于裂殖壶菌有自然沉降作用,在强化实验时实验各组必须充分通气,保证裂殖壶菌悬浮在实验水体中,保证强化效果。

3.2 轮虫作为DHA的营养载体

比较强化试验结果不难看出,在质量浓度分别为50 mg/L和80 mg/L的裂殖壶菌饵料强化组中,轮虫的强化效果十分明显。实验开始时各组均未有DHA检出,强化12h后,C组轮虫体内DHA质量比达到了7.85 mg/g,D组达到了8.14 mg/g,DHA含量增加显著,两组之间的DHA含量差异是由于裂殖壶菌的添加量不同所造成的。12h后实验B组轮虫体内DHA质量比为4.42 mg/g,与C,D两组的結果相差较大,这可能是由于该组裂殖壶菌的添加量过低而造成的强化效果不佳,这和裂殖壶菌影响轮虫生长和繁殖的观察结果相一致。对照组则明显不同,实验18h内均未见有DHA检出,因而,仅用绿球藻营养

强化轮虫是不妥的。研究表明轮虫体内的 DHA 含量的多少,对大菱鲆、牙鲆等经济鱼种育苗时的成活率、白化率有很大影响。综合两组实验结果可知,用裂殖壶菌强化轮虫能明显促进轮虫的生长和发育,并显著提高轮虫体内的 DHA 含量。

致谢:黄海水产研究所麦岛渔业科学试验基地在本实验中给予大力协助,特此致谢。

参考文献:

[1] Yokochi T, Honda D, Higashihara T, *et al.* Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, **49**(1):72-76.
 [2] Yaguchi T, Tanaka S, Yokochi T, *et al.* Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Schizochytrium* sp. strain SR21[J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1997, **74**(11):1 431-1 434.
 [3] Hammond B G, Mayhew D A, Robinson K, *et al.* Safety assessment of DHA-Rich microalgae from *Schizochytrium* sp. [J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2001, **33**: 356-362.
 [4] 张学成,谭桂英.耐低温轮虫的大规模培养[J]. *海洋科学*,1993, **5**(3):1-3.
 [5] 宫春光.褶皱臂尾轮虫室内培养及在牙鲆育苗中的应用[J]. *水产科学*,2004, **23**(4):24-26.
 [6] 陈兆芳.轮虫的室内高密度培养与营养强化[J]. *中国*

水产,1999, **8**:40-41.
 [7] 熊坂清弘.“海洋酵母”和 EPA·DHA 强化饲料[J]. *养殖(日)*,1993, **30**(12):108-109.
 [8] 张利民,常建波,张秀珍,等.50DE 微囊营养强化轮虫 DHA 的研究[J]. *中国水产科学*,1997, **4**(5):44-49.
 [9] 张利民,常建波,张秀珍,等. r3 多价不饱和脂肪酸营养强化轮虫技术研究[J]. *水产学报*,1997, **21**(4):415-421.
 [10] 张利民.稚鱼生物饲料的 DHA 营养强化[J]. *齐鲁渔业*,1996, **13**(5):36-38.
 [11] 刘镜恪,雷霖霖,宫怀孔.海水仔稚鱼对脂类的需求[J]. *齐鲁渔业*,1996, **13**(1):19-21.
 [12] Chang Y X, Wang W, Wu J M, *et al.* Effects of dietary lipid sources on fatty acid composition of rotifer *Brachionus plicatilis*[J]. *Journal Of Fishery Sciences Of China*, 2001, **8**(4):52-57.
 [13] 陈德富,邱其樱.冷冻酵母培养 S 型褶皱臂尾轮虫的效果[J]. *福建水产*,1996, **6**(2):30-32.
 [14] 张道南.利用啤酒酵母活菌株培养褶皱臂尾轮虫的研究[J]. *水产学报*,1983, **7**(2):30-32.
 [15] 王堉,梁亚全.褶皱臂尾轮虫繁殖和培养的研究[J]. *海洋水产研究*,1980, **1**:27-48.
 [16] 沈小婉.脂肪酸的测定[M]. *北京:北京大学出版社*,1992. 57-60.
 [17] 廖启斌.海洋微藻脂肪酸的气相色谱分析[J]. *海洋通报*,2000, **19**(6):66-70.

Studies on the DHA enrichment of rotifer with *Schizochytrium limanum*

SONG Xiao-jin¹, ZHANG Xue-cheng¹, ZHU Lu-ying¹, LI Di-er²

(1. Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Qingdao Samuels Industrial & Commercial Co. Ltd. Qingdao 266101, China)

Received: Jan., 20, 2005

Key words: Enrichment; DHA; rotifer; *Schizochytrium limanum*

Abstract: *Schizochytrium limanum* is a kind of marine fungus with high DHA content. In our studies, rotifer *Brachionus plicatilis* was enriched with *S. limanum*. The variation of physiology and ecology of rotifer during the experiments was observed and the DHA in rotifer was evaluated. The results showed that: all of the three enriching groups got better results than the control group. DHA content increased obviously and reached the maximum after 12 h enrichment. The max DHA/FA content of the testing groups reached 5.98% 10.21% and 13.44% respectively, and the max DHA content reached 4.42 mg/g 7.85 mg/g and 8.14 mg/g respectively. No DHA was detected in the control group in the whole experiments. Other indexes such as rotifer density, egg-hanging rate in the testing groups were also obviously better than those of the control group. Compared with the egg-hanging rates in the control group, 20.1%, the egg-hanging rates in the testing groups had reached 34.8%, 46.5% and 53.7% respectively.

(本文编辑:张培新)