

文章编号: 1674-5566(2024)02-0352-09

DOI: 10.12024/jsou.20230104065

单胞藻和破囊壶菌对卤虫幼体高密度短期营养强化条件和效果的探究

高美荣¹, 邓洪刚¹, 邢明威¹, 加晶^{2,3}, 周广航^{2,3}, 龙菲平^{2,3}, 吴星宇^{2,3},
王 编^{2,3}, 隋丽英¹

(1. 天津科技大学 海洋与环境学院 亚洲区域卤虫参考中心, 天津 300457; 2. 国投生物科技投资有限公司, 北京 100034; 3. 微藻生物能源与资源北京市重点实验室, 北京 100142)

摘要: 本研究以商业化生产的湛江等边金藻、三角褐指藻和破囊壶菌干粉为强化剂, 探究其对高密度卤虫幼体短期营养强化的条件, 并在最适条件下分别强化美国大盐湖和乌兹别克斯坦威海两个品系的卤虫幼体, 探究两种单胞藻和破囊壶菌对不同品系卤虫 n-3 高不饱和脂肪酸(n-3 HUFA)的强化效果。结果表明, 利用湛江等边金藻, 在不同强化剂量(0.05、0.1、0.15和0.2 g/L)和不同强化时间(12、18和24 h)条件下进行高密度卤虫强化(150、200和250 ind./mL), 强化后卤虫存活率均在85%~90%, 且随强化时间的延长和强化剂量的增加, 卤虫个体体长和总生物量有所增加。考虑到育苗场对卤虫个体大小的要求和可操作性, 建议卤虫幼体最佳强化密度为150~200 ind./mL, 微藻强化剂量为0.1~0.2 g/L, 强化时间为12~24 h。卤虫 n-3 HUFA 强化效果与强化剂种类和卤虫品系密切相关。对于大盐湖卤虫而言, 强化三角褐指藻和湛江等边金藻强化的卤虫幼体 EPA 含量分别为7.39 mg/g dw 和3.20 mg/g dw, 与初孵卤虫 EPA 含量1.63 mg/g dw 相比显著增加; 对于威海卤虫幼体, 与初孵卤虫 EPA 含量14.35 mg/g dw 相比, 两种单胞藻强化的卤虫幼体 EPA 有所增加(分别为17.59 mg/g dw 和17.26 mg/g dw), 这与威海卤虫幼体中较高的 EPA 本底含量有关。强化两种单胞藻对两个品系卤虫的 DHA 含量没有显著提升作用, 但破囊壶菌强化威海卤虫幼体的 DHA 含量达到2.31 mg/g dw, 这与破囊壶菌本身较高的 DHA 含量(115 mg/g dw)有关。本研究为开发单胞藻营养强化剂和高密度短期卤虫营养强化技术在水产育苗中的应用提供了数据参考。

关键词: 单胞藻; 破囊壶菌; 卤虫; 营养强化; n-3 HUFA

中图分类号: S 963.1 **文献标志码:** A

卤虫(*Artemia*)幼体和成虫是水产动物苗种生产中重要的生物饵料。卤虫含有丰富的蛋白质和脂类, 在海水鱼虾蟹的育苗阶段投喂卤虫, 可提高水产苗种的成活率, 促进生长, 增加其对环境胁迫的耐受性^[1]。EPA 和 DHA 等高不饱和脂肪酸(HUFA)是海水鱼虾蟹必需的脂肪酸, 但与野生桡足类相比, 卤虫 EPA 含量普遍较低, DHA 含量极低, 并且不同产地(品系)的卤虫 EPA 和 DHA 含量有较大差异^[2-3]。

卤虫是非选择性滤食浮游动物, 可将一定粒

度的、富含 HUFA 的乳化鱼油、微颗粒饲料等在较短的时间内包裹于肠道中, 从而有效提升卤虫的 HUFA 含量^[4]。海水鱼虾蟹幼苗通过摄食经过营养强化的卤虫, 获得机体生长和发育必需的 HUFA, 同时避免将营养物质直接投入养殖水体所造成的浪费和水质污染。

海洋微藻含有丰富的蛋白质、脂肪、不饱和脂肪酸、多糖和色素, 其较小的细胞不仅是卤虫极佳的饵料, 还可作为强化剂用于卤虫的营养强化, 改善卤虫的营养^[5]。研究^[6]表明, 以盐生微拟

收稿日期: 2023-01-16

修回日期: 2023-07-15

基金项目: 水生动物免疫增强剂的研发及其在水产养殖中的应用(DL2021002001L)

作者简介: 高美荣(1990—), 女, 硕士, 研究方向为健康水产养殖。E-mail: gaomr511@tust.edu.cn

通信作者: 隋丽英, E-mail: suily@tust.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

球藻(*Nanochloropsis salina*)强化投喂卤虫 8 h,可提高卤虫不饱和脂肪酸含量超 56.5%,其中 ARA、EPA 和 DHA 含量分别提高 9.5%、25.8% 和 4.18%,优于面包酵母的强化效果。用 5 种富含 EPA 和 DHA 的鲜活小球藻(*Chlorella* sp.)、球等边金藻(*Isochrysis galbana*)、绿色巴夫藻(*Pavlova viridis*)、紫绿藻(*Porphyridium* sp.)和小新月菱形藻(*Chaetoceros gracilis*)强化卤虫幼体 24 h,并将强化后的卤虫幼体投喂红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)仔鱼,发现强化卤虫的 HUFA(尤其是 DHA 和 EPA)水平对提高仔鱼的成活率、生长和耐高盐能力具有重要作用,其中球等鞭金藻和绿色巴夫藻的强化效果最佳^[7]。但上述报道中强化卤虫密度很低(1~50 ind./mL),低密度强化造成育苗场设施过度占用、强化剂使用成本增加等问题。

本研究以商业化生产的三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornerutum*)、湛江等鞭金藻(*Isochrysis zhanjiangensis*)和破囊壶菌(*Schizochytrium aggregatum*)干粉为强化剂,对源自美国大盐湖和乌兹别克斯坦咸海的卤虫无节幼体进行高密度短期强化,通过评价卤虫存活率和体长等指标,明确其卤虫幼体的最佳强化密度、强化剂量和强化时间;通过分析强化卤虫的脂肪酸组成和含量,探究上述强化剂对不同品系卤虫的强化效果,研究结果为开发单胞藻卤虫强化剂和在我国育苗场推广高密度卤虫短期强化技术提供参考。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

本研究所用卤虫幼体为美国大盐湖(*Artemia franciscana*, GSL)和乌兹别克斯坦咸海(*A. parthenogenetica*)卤虫卵所孵化。

强化剂三角褐指藻、湛江等鞭金藻和破囊壶菌干粉由国投生物科技投资有限公司提供。在显微镜(德国 Leica)下测定强化剂的细胞粒径和单位重量干粉中细胞数量,其细胞大小:三角褐指藻 8~20 μm 、湛江等边金藻 4~7 μm 、破囊壶菌 10~15 μm 。每克干粉含有的藻细胞数量:三角褐指藻 1.875×10^{10} cells/g、湛江等边金藻 2.625×10^{10} cells/g 和破囊壶菌 2×10^9 cells/g。3 种强化剂细胞大小均在卤虫的滤食粒径范围内(小于 50 μm),本研究选用粒径最小的湛江等边金藻进行最佳条件的研究。

上述强化剂的脂肪酸组成及含量见表 1。两种单胞藻和破囊壶菌干粉的脂肪酸组成和含量不同。对 HUFA 含量而言,三角褐指藻 EPA 含量最高(37.53 mg/g dw),湛江等边金藻 DHA 含量较高(14.85 mg/g dw),破囊壶菌 DHA 含量最高(157.31 mg/g dw)。

1.2 实验方法

1.2.1 卤虫孵化

取 2 g 卤虫卵置于 1 L 盐度 30 g/L 的稀释卤水中,孵化 24 h。卤虫卵孵化条件:温度 28 $^{\circ}\text{C}$,光照 2 000 lx,连续充气。收集并用盐度 30 g/L 的稀释卤水充分冲洗卤虫幼体,置于 8 L 锥形容器中进行强化。

为更准确地表征强化效果,本研究强化卤虫组别均与不同条件下的饥饿卤虫(仅消耗自身营养物质)进行了比较。同时根据鱼油强化剂产品[SELCO S. presso, INVE (THAILAND) Ltd.]的推荐参数,设置了强化密度、强化剂量及强化时间的参数和梯度。

1.2.2 卤虫强化密度探索

卤虫幼体初始密度分别为 150、200 和 250 ind./mL,以湛江等边金藻为强化剂,强化剂量为 0.1 g/L(分两次于 0 h 和 12 h 投加),强化时间为 24 h。强化温度 25 $^{\circ}\text{C}$,强化期间曝气以维持较高的溶解氧水平,单位水体 8 L。以初始密度 200 ind./mL 的 24 h 饥饿卤虫为对照。每个组别设置 3 个重复。

1.2.3 卤虫强化剂量探索

卤虫幼体初始强化密度为 200 ind./mL,以湛江等边金藻为强化剂,强化剂量分别为 0.05、0.1、0.15 和 0.2 g/L(分两次于 0 h 和 12 h 投加),强化时间为 24 h。其他条件同 1.2.2 节。

1.2.4 卤虫强化时间探索

卤虫幼体初始投放密度为 200 ind./mL,以湛江等边金藻为强化剂,强化剂量为 0.2 g/L,强化时间分别为 12、18 和 24 h。以不同时间、初始密度 200 ind./mL 的 24 h 饥饿卤虫为对照。其他条件同 1.2.2 节。

1.2.5 不同品系卤虫的强化效果比较

分别收集孵化 24 h 后的 GSL 和咸海卤虫幼体,卤虫幼体初始密度为 200 ind./mL,以三角褐指藻、湛江等边金藻和破囊壶菌干粉为强化剂,强化剂量为 0.2 g/L(分别在 0 h 和 12 h 投加),强化时间为 24 h。其他条件同 1.2.2 节。

表 1 三角褐指藻、湛江等边金藻和破囊壶菌的脂肪酸组成和含量
 Tab. 1 Fatty acid profile of *P. tricornutum*, *I. zhanjiangensis* and *S. aggregatum*

脂肪酸 Fatty acids/(mg/g dw)	三角褐指藻 <i>P. tricornutum</i>	湛江等边金藻 <i>I. zhanjiangensis</i>	破囊壶菌 <i>S. aggregatum</i>
C14:0	11.14	31.62	9.29
C14:1 n-5	0.70	1.45	1.36
C15:0	0.41	0.73	0.49
C15:1 n-5	0.88	1.08	0.04
C16:0	15.70	17.77	129.09
C16:1 n-7	27.93	10.61	1.44
C17:0	0.08	0.12	0.32
C17:1 n-7	6.42	1.08	0.95
C18:0	0.67	0.41	4.26
C18:1 n-9	5.82	15.14	1.96
C18:2 n-6	3.45	11.85	0.78
C18:3 n-6	1.02	36.07	2.18
C18:3 n-3	1.28	21.67	1.00
C20:0	0.25	0.03	0.59
C20:1 n-9	0.27	9.22	0.20
C20:4 n-6	1.35	0.70	2.93
C20:3 n-3	0.32	0.13	0.34
C20:5 n-3 EPA	37.53	1.54	2.94
C22:0	0.10	0.43	0.11
C22:1	0.41	0.85	0.83
C23:0	1.58	0.63	1.31
C22:6 n-3 DHA	3.83	14.85	157.31
总脂肪酸含量 Total fatty acids	121.42	180.11	322.00

1.3 指标分析

1.3.1 卤虫存活率

强化结束后,从每个强化罐中随机取水样 100 mL,共取样 4 次。记录每组卤虫无节幼体存活数,计算卤虫存活率。

1.3.2 卤虫体长

强化结束后,随机从每个强化罐中取 20 只卤虫,在体视显微镜(SZX12,宁波舜宇仪器有限公司)下测量卤虫体长(即从头部顶端到尾部分叉端的距离),计算体长增长率(Lengh growth rate,LGR)。

$$R_{LGR}=(L_1-L_0)/L_0\times 100\% \quad (1)$$

式中: R_{LGR} 为体长增长率,%; L_1 为实验结束时卤虫幼体体长, μm ; L_0 为初孵卤虫幼体体长, μm 。

1.3.3 卤虫总生物量

强化结束后,用滤网收集卤虫,用蒸馏水反复冲洗除去体表附着的强化剂和盐分,吸干表面水分后称重,获得卤虫生物量。

1.3.4 卤虫脂肪酸组成和含量分析

将收集的卤虫进行冷冻干燥(德国 Marin

Christ)。精确称取冻干样品约 0.03 g,加入 1 mg 脂肪酸内标 C20:2 n-6(美国 NU-CHEK PREP)。分别加入 5 mL 甲醇:甲苯(3:2, V:V)和新鲜配制的 5 mL 氯乙酰:甲醇(1:20, V:V),充分匀浆后煮沸 1 h 进行脂肪酸甲酯化。用正己烷萃取脂肪酸甲酯并浓缩,用气相色谱(日本岛津)进行脂肪酸组成和含量测定^[2]。

1.4 数据处理

除强化剂脂肪酸组成与含量数据外,其他数据均利用 SPSS 25.0 统计分析软件对数据进行 ANOVA 单因素分析和 Duncan's 多重比较分析($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 强化密度

强化 24 h 后,各组卤虫存活率为 80.04%~84.67%,无显著差别($P>0.05$),饥饿卤虫组存活率为 80.04%。与初孵卤虫幼体体长[(447.73±43.67) μm]和初孵卤虫幼体(密度 200 ind./mL)总

生物量 $[(13.19\pm 0.02) \text{ g}]$ 相比,饥饿和强化 24 h 后各组卤虫体长和卤虫幼体总生物量显著增加。与饥饿卤虫相比,强化卤虫体长显著增加($P < 0.05$),且 150 ind./mL 组显著大于 250 ind./mL 组

($P < 0.05$)。与相同初始密度的饥饿卤虫相比,强化 24 h 后,200 ind./mL 组卤虫生物量显著提高($P < 0.05$),且强化后卤虫生物量随初始卤虫密度的增加而增加($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 不同强化密度对卤虫幼体存活率、体长和总生物量的影响
Tab. 2 Effect of enrichment density on survival, body length and total biomass of *Artemia* nauplii

组别 Group	强化密度 Enrichment density/ (ind./mL)	存活率 Survival rate/%	体长 Body length/ μm	总生物量 Total biomass/g (湿重)	体长增加百分比 Growth percentage of body length/%
初孵卤虫幼体组 Newly-hatched <i>Artemia</i>	-	-	447.73 \pm 43.67	13.19 \pm 0.02	-
强化卤虫组 Enrichment	150	84.14 \pm 2.72	770.27 \pm 59.90 ^a	19.41 \pm 0.22 ^c	72.04 \pm 4.13
	200	84.67 \pm 3.70	754.54 \pm 65.13 ^{ab}	23.19 \pm 0.36 ^b	68.53 \pm 3.68
	250	84.40 \pm 1.37	739.59 \pm 66.33 ^b	27.45 \pm 1.09 ^a	65.19 \pm 5.21
饥饿卤虫组 Starvation	200	80.04 \pm 0.52	713.06 \pm 53.89 ^c	19.99 \pm 0.42 ^c	59.26 \pm 3.46

注:同列中标有不同字母的数值间差异显著($P < 0.05$),标有相同字母的数值间差异不显著($P > 0.05$)。

Notes: Means with different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$), and means with the same letters are not significantly different ($P > 0.05$).

2.2 强化剂量

不同强化剂量组别卤虫的存活率均高于 85%,无显著差别($P > 0.05$)。强化剂量为 0.2 g/L 时,卤虫幼体体长显著高于强化剂量 0.1 g/L、0.05 g/L 和饥饿卤虫组($P < 0.05$)。与初孵卤虫幼

体相比,强化剂量 0.2 g/L 组卤虫体长增加了(91.11 \pm 4.71)%。与初孵幼体总生物量相比,强化组总生物量有所增加,强化剂量 0.2 g/L 组卤虫总生物量显著高于其他组别($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 不同强化剂量对卤虫幼体存活率、体长和总生物量的影响
Tab. 3 Effect of enrichment dose on survival, body length and total biomass of *Artemia* nauplii

组别 Group	强化剂量 Enrichment dose/ (g/L)	存活率 Survival rate/%	体长 Body length/ μm	总生物量 Total biomass/g (湿重)	体长增加百分比 Growth percentage of body length/%
初孵卤虫幼体组 Newly-hatched <i>Artemia</i>	-	-	447.73 \pm 43.67	13.19 \pm 0.02	-
强化卤虫组 Enrichment	0.05	90.00 \pm 3.16	781.75 \pm 57.02 ^c	23.68 \pm 0.61 ^c	74.10 \pm 4.71 ^{bc}
	0.10	86.25 \pm 3.70	806.49 \pm 68.44 ^{bc}	24.59 \pm 0.25 ^{bc}	79.49 \pm 9.92 ^{bc}
	0.15	85.00 \pm 5.50	827.81 \pm 76.50 ^{ab}	25.28 \pm 0.80 ^b	85.18 \pm 2.99 ^{ab}
	0.20	88.75 \pm 4.87	854.71 \pm 71.75 ^a	29.97 \pm 0.80 ^a	91.11 \pm 0.98 ^a
饥饿卤虫组 Starvation	-	90.00 \pm 47.07	778.80 \pm 76.69 ^c	21.45 \pm 0.33 ^d	73.64 \pm 4.71 ^c

注:同列中标有不同字母的数值间差异显著($P < 0.05$),标有相同字母的数值间差异不显著($P > 0.05$)。

Notes: Means with different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$), and means with the same letters are not significantly different ($P > 0.05$).

2.3 强化时间

强化 12、18 和 24 h 后,卤虫幼体存活率均在 88% 以上;虽然延长强化时间使卤虫存活率有所降低,但各组间无显著差异($P > 0.05$)。随强化和饥饿时间延长,卤虫幼体体长显著增加($P < 0.05$),强化 18 h 和 24 h 组卤虫总生物量显著性大于其他组别($P < 0.05$),见表 4。

2.4 不同品系卤虫的强化效果

2.4.1 美国大盐湖卤虫

大盐湖卤虫初孵幼体 EPA 含量很低(1.63 mg/g dw),DHA 含量极低(0.03 mg/g dw);饥饿 24 h 后,EPA 含量为 1.05 mg/g dw,DHA 含量为 0.01 mg/g dw。与饥饿卤虫相比,两种单胞藻强化的大盐湖卤虫脂肪酸含量均有不同程度

的提高,三角褐指藻和湛江等边金藻强化的卤虫幼体 EPA 含量分别为 7.39 mg/g dw 和 3.20 mg/g dw, DHA 含量分别为 0.07 mg/g dw 和 0.32 mg/g dw (表 5)。

表 4 不同强化时间对卤虫幼体存活率、体长和总生物量的影响
Tab. 4 Effect of enrichment duration on survival, body length and total biomass of *Artemia nauplii*

组别 Group	强化时间 Enrichment time/h	存活率 Survival rate/%	体长 Body length/ μm	总生物量 (湿重) Total biomass/g	体长增加百分比 Growth percentage of body length/%
初孵卤虫幼体组 Newly-hatched <i>Artemia</i>	-	-	447.73 \pm 43.67	13.19 \pm 0.02	-
强化卤虫组 Enrichment	12	93.75 \pm 10.67	805.87 \pm 62.62 ^{bc}	28.68 \pm 1.33 ^b	80.00 \pm 0.32 ^{bc}
	18	92.50 \pm 5.00	829.98 \pm 47.67 ^{ab}	30.44 \pm 0.34 ^a	85.37 \pm 2.01 ^{ab}
	24	88.75 \pm 4.87	854.71 \pm 71.75 ^a	30.78 \pm 0.31 ^a	90.90 \pm 2.40 ^a
饥饿卤虫组 Starvation	12	92.50 \pm 5.00	753.54 \pm 88.63 ^d	24.89 \pm 0.20 ^d	68.30 \pm 7.32 ^d
	18	91.25 \pm 6.61	768.38 \pm 59.31 ^{cd}	25.08 \pm 0.55 ^{cd}	71.62 \pm 5.31 ^{cd}
	24	90.00 \pm 7.07	778.80 \pm 76.69 ^{cd}	26.23 \pm 0.48 ^c	73.94 \pm 4.38 ^{cd}

注: 同列中标有不同字母的数值间差异显著 ($P < 0.05$), 标有相同字母的数值间差异不显著 ($P > 0.05$)。

Notes: Means with different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$), and means with the same letters are not significantly different ($P > 0.05$).

表 5 两种单胞藻强化的大盐湖卤虫幼体的脂肪酸组成及含量
Tab. 5 Fatty acid profile of GSL *Artemia nauplii* enriched with two microalgae

脂肪酸 Fatty acids / (mg/g dw)	强化卤虫 Enriched <i>Artemia</i>		饥饿卤虫 Starved <i>Artemia</i>	初孵无节幼体 Newly-hatched <i>Artemia</i>
	三角褐指藻 <i>P. tricornutum</i>	湛江等边金藻 <i>I. zhanjiangensis</i>		
C14:0	1.08	1.11	0.50	0.88
C14:1 n-5	0.94	0.92	0.67	1.51
C15:0	0.21	0.19	0.14	0.19
C15:1 n-5	0.51	0.49	0.41	0.63
C16:0	12.65	10.77	8.72	16.33
C16:1 n-7	4.62	2.92	1.43	3.65
C17:0	0.70	0.56	0.49	0.47
C17:1 n-7	0.81	0.69	0.53	2.11
C18:0	8.61	7.39	6.44	6.72
C18:1 n-9	21.84	19.58	17.42	28.76
C18:1 n-7	8.03	6.77	7.20	6.92
C18:2 n-6	6.35	5.60	4.81	10.76
C18:3 n-6	30.43	27.20	21.50	49.58
C18:3 n-3	4.24	4.98	4.35	9.27
C20:0	0.23	0.24	0.77	0.39
C20:1 n-9	0.89	0.77	1.16	0.86
C20:4 n-6	0.67	0.62	0.54	0.46
C20:3 n-3	1.32	4.98	1.06	1.54
C20:5 n-3 EPA	7.39	3.20	1.05	1.63
C22:1	0.38	0.37	0.24	0.65
C22:6 n-3 DHA	0.07	0.32	0.01	0.03
总脂肪酸含量 Total fatty acids	111.97	99.67	79.44	143.34

与饥饿卤虫相比,强化三角褐指藻卤虫 EPA 含量增加 604%, 强化湛江等边金藻卤虫 EPA 含量增加 205%; 而强化湛江等边金藻卤虫 DHA 含量增加 2 900%, 强化三角褐指藻卤虫 DHA 含量

增加 600%。但与初孵无节幼体相比,强化三角褐指藻卤虫 EPA 含量增加 353%, 强化湛江等边金藻卤虫 DHA 含量增加 967% (图 1)。

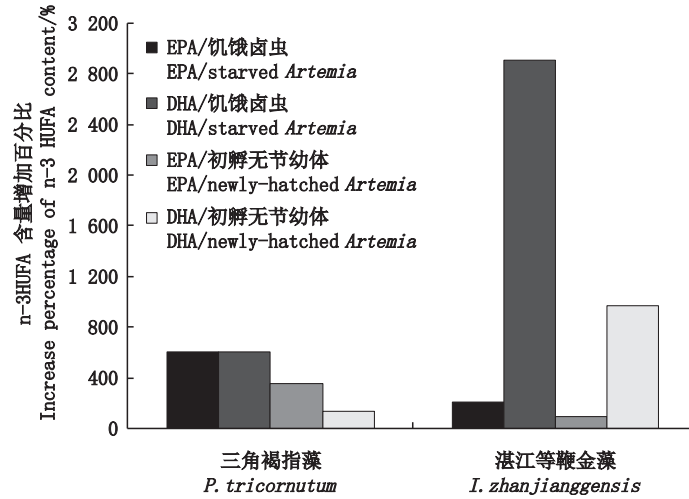


图1 两种单胞藻强化的大盐湖卤虫幼体EPA和DHA含量增加百分比

Fig. 1 Percentage increase of EPA and DHA content of GSL Artemia enriched with *P. tricornutum* and *I. zhanjiangensis*

2.4.2 威海卤虫

针对威海卤虫的营养强化,除了以三角褐指藻和湛江等边金藻为强化剂外,还选用了DHA含量高的破囊壶菌。威海卤虫初孵幼体EPA含量为14.35 mg/g dw, DHA含量为0.02 mg/g dw;饥饿24 h后EPA含量为16.60 mg/g dw, DHA含量为0.06 mg/g dw。与饥饿卤虫相比,强化24 h后,威海卤虫脂肪酸含量均有不同程度变化,三角褐指藻和湛江等边金藻强化卤虫的EPA含量有所增加,但破囊壶菌强化卤虫的DHA含量明显增加(2.31 mg/g dw),见表6。与饥饿卤虫相比,强化破囊壶菌卤虫幼体DHA含量增加3 750%;与初孵无节幼体相比,强化破囊壶菌卤虫幼体DHA含量增加11 450%(图2)。

3 讨论

单胞藻是卤虫的天然生物饵料,其营养组成(如蛋白、脂肪、氨基酸、脂肪酸和多糖等)以及天然色素种类和含量等与藻种和培养条件相关^[8]。本研究采用两种水产养殖常用的海洋微藻干粉产品,其中三角褐指藻EPA含量较高(37.53 mg/g dw),湛江等边金藻DHA较高(14.85 mg/g dw)。破囊壶菌是单细胞海洋真菌,是生产DHA的理想生物资源,本研究所用囊壶菌DHA含量为157.31 mg/g dw。

卤虫的营养强化可采用“短期营养强化”和“长期强化培养”两种方式。“短期营养强化”一般在30 h内完成^[9],既能使卤虫将需强化的营养物质包裹于肠道内,又可以减少卤虫对营养物质的

代谢和转化利用^[10]。卤虫强化效果与强化剂种类、强化剂量、强化时间、卤虫品系和卤虫的生长阶段有关^[11]。陆建学等^[12]采用强化剂量分别为0.075、0.15和0.225 g/L南极大磷虾粉(*Euphausia superba*)对卤虫幼体进行脂肪酸强化,卤虫密度为45~50 ind./mL,强化时间分别6、12和18 h,强化后各组卤虫幼体的DHA和EPA含量均显著高于未强化组,但以强化剂量0.15 g/L、强化时间12 h和18 h的效果最佳。张跃群等^[13]采用鲜活小球藻、亚心形扁藻和湛江叉鞭金藻强化三龄期卤虫幼体,卤虫密度为1 ind./mL,强化48 h后各强化组卤虫幼体EPA含量均显著高于未强化组,其中扁藻组含量最高,其次为小球藻组。黄旭雄等^[14]用鲜活小球藻、球等边金藻和新月菱形藻,以及螺旋藻干粉和强化剂V分别进行6 h和12 h强化,卤虫密度为16 ind./mL,发现卤虫脂肪酸的强化效果与强化剂和强化时间有关,用微藻强化12 h效果较好,而用强化剂V强化6 h效果更佳。本研究以湛江等边金藻为强化剂,针对大盐湖卤虫幼体进行营养强化,在高卤虫密度(150~200 ind./mL)强化12~24 h,卤虫存活率均在85%以上,说明采用该强化条件进行卤虫强化可行。基于强化卤虫存活率和体长等指标,考虑到育苗场对卤虫个体大小的要求和可操作性,我们提出卤虫最佳强化条件为:幼体强化密度150~200 ind./mL,强化剂量0.1~0.2 g/L,强化时间12~24 h。与低密度卤虫强化相比,高密度卤虫强化可节约强化设施设备和强化剂的投入成本。

表6 两种单胞藻和破囊壶菌强化的咸海卤虫幼体脂肪酸组成及含量
 Tab. 6 Fatty acid profile of Aral Lake *Artemia* nauplii enriched with two microalgae and *S. aggregatum*

脂肪酸 Fatty acid / (mg/g dw)	强化卤虫 Enriched <i>Artemia</i>			饥饿卤虫 Starved <i>Artemia</i>	初孵卤虫幼体 Newly-hatched <i>Artemia</i>
	三角褐指藻 <i>P. tricornutum</i>	湛江等边金藻 <i>I. zhanjiangensis</i>	破囊壶菌 <i>S. aggregatum</i>		
C14:0	1.45	1.60	1.22	1.41	2.50
C14:1 n-5	0.71	0.78	0.59	0.72	0.66
C15:0	0.43	0.47	0.37	0.70	0.55
C15:1 n-5	0.56	0.61	0.48	0.59	0.42
C16:0	12.58	13.04	12.56	12.39	15.05
C16:1 n-7	14.10	14.32	10.92	13.47	16.05
C17:0	0.69	0.79	0.63	0.76	0.40
C17:1 n-7	1.73	1.93	1.51	1.83	1.52
C18:0	5.85	6.06	5.50	6.02	3.49
C18:1 n-9	22.47	24.09	19.84	22.93	17.90
C18:1 n-7	13.45	13.46	11.67	13.04	-
C18:2 n-6	5.84	6.25	4.98	5.84	3.82
C18:3 n-6	10.26	11.10	8.64	10.20	0.55
C18:3 n-3	2.40	2.73	2.09	2.50	10.09
C20:0	0.57	0.73	0.86	0.95	-
C20:1 n-9	1.11	1.22	1.15	1.26	0.49
C20:4 n-6	1.43	1.55	1.76	1.64	1.00
C20:3 n-3	0.02	0.03	0.02	0.02	-
C20:5 n-3 EPA	17.59	17.26	14.71	16.60	14.35
C22:0	0.22	0.46	0.21	0.72	0.13
C22:1	0.77	0.63	0.79	0.71	0.58
C22:6 n-3 DHA	0.03	0.07	2.31	0.06	0.02
总脂肪酸含量 Total fatty acids	114.26	119.18	102.81	114.36	89.57

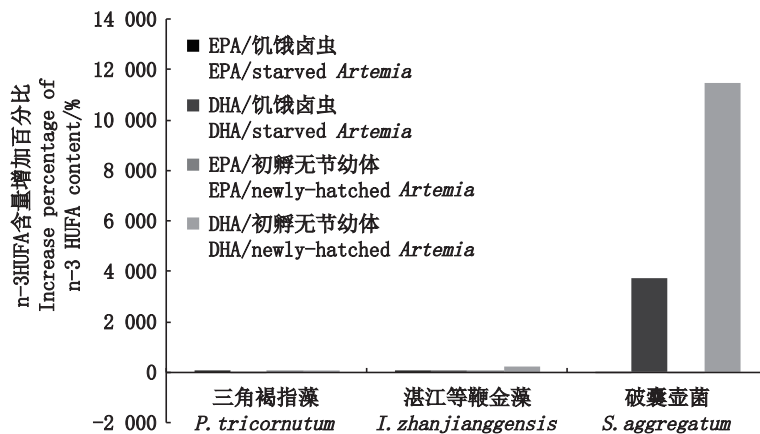


图2 两种单胞藻和破囊壶菌强化的咸海卤虫幼体EPA和DHA含量增加百分比

Fig. 2 Percentage increase of EPA and DHA content of Aral Lake *Artemia* enriched by *P. tricornutum*, *I. zhanjiangensis* and *S. aggregatum*

由于环境中饵料、温度和盐度的差异,不同产地(品系),甚至同一品系不同年份和不同季节采收的卤虫,其脂肪酸含量尤其是EPA和DHA含量有较大差别^[2-3]。因此,在培育对饵料n-3 HUFA有需求的海水鱼和甲壳类水产苗种时,针对n-

3 HUFA含量较低的卤虫品系,通常进行EPA和DHA的强化^[2,15]。本研究针对在水产育苗中广泛使用的大盐湖卤虫和咸海卤虫品系进行脂肪酸强化效果对比分析,对于EPA本底含量较低的大盐湖卤虫而言,三角褐指藻组和湛江等鞭金藻强

化的卤虫幼体 EPA 含量幅度增加较为显著;对于 EPA 本底较高的威海卤虫幼体,两种单胞藻强化后卤虫 EPA 含量增加幅度较小,而破囊壶菌强化威海卤虫幼体的 DHA 含量达到 2.31 mg/g dw,这与破囊壶菌本身较高的 DHA 含量(115 mg/g dw)有关。因此,强化卤虫 n-3 HUFA 含量的提升幅度不仅取决于强化剂的脂肪酸组成和含量,而且与卤虫本底脂肪酸组成和含量有关。

需要指出的是,本文仅比较了不同单胞藻强化的卤虫 EPA 和 DHA 含量,评价了其对于 n-3 HUFA 强化效果。与鱼油乳化剂和破囊壶菌相比,除脂肪酸外,单胞藻中还富含其他的营养和活性成分(如单细胞蛋白、色素和藻类多糖等),今后应针对单胞藻对卤虫的全营养强化效果做进一步的分析和评价,为将单胞藻开发成为卤虫全营养强化剂提供数据支撑。

4 结论

本研究通过评价湛江等边金藻强化卤虫的存活率、体长和总生物量等指标,明确了单胞藻短期强化卤虫幼体的最适条件,即卤虫密度 150~250 ind./mL,强化剂量 0.05~0.2 g/L,强化时间 12~24 h。强化卤虫 n-3 HUFA 含量的提升效果与强化剂种类有关,但不同品系卤虫偏好的强化剂亦有不同。强化三角褐指藻和湛江等边金藻对大盐湖卤虫 EPA 有显著提升作用,但对威海卤虫 EPA 和 DHA 含量的提升较少,而破囊壶菌强化使威海卤虫幼体 DHA 含量显著提升。

参考文献:

- [1] SORGELOOS P, DHERT P, CANDREVA P. Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture [J]. *Aquaculture*, 2001, 200(1/2): 147-159.
- [2] 刘晓翠,邓洪刚,于学权,等. 不同产地卤虫幼体对云龙石斑鱼幼苗生长和抗胁迫能力的影响[J]. *天津科技大学学报*, 2022, 37(2): 18-23.
LIU X C, DENG H G, YU X Q, et al. Effects of different *Artemia* strains on growth and stress resistance of hybrid grouper juveniles [J]. *Journal of Tianjin University of Science & Technology*, 2022, 37(2): 18-23.
- [3] 邢明威,邓洪刚,高美荣,等. 不同产地卤虫幼体对凡纳滨对虾仔虾生长、肌肉组分和抗胁迫能力的影响[J]. *中国水产科学*, 2022, 29(1): 70-78.
XING M W, DENG H G, GAO M R, et al. Effects of *Artemia* from different origins on growth, muscle composition, and stress resistance of *Litopenaeus vannamei* postlarvae [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2022, 29(1): 70-78.
- [4] VAN STAPPEN G. *Artemia* [M]//LAVENS P, SORGELOOS P. *Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture*. Rome: FAO, 1996: 101-154.
- [5] FÁBREGAS J, OTERO A, DOMÍNGUEZ A, et al. Growth rate of the microalga *Tetraselmis suecica* changes the biochemical composition of *Artemia* species [J]. *Marine Biotechnology*, 2001, 3(3): 256-263.
- [6] CHAKRABORTY R D, CHAKRABORTY K, RADHAKRISHNAN E V. Variation in fatty acid composition of *Artemia salina* nauplii enriched with microalgae and baker's yeast for use in larviculture [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(10): 4043-4051.
- [7] 赵明日,孙世春. 5种微藻在红鳍东方鲀仔鱼培育中的效果研究[J]. *水产科学*, 2007, 26(8): 449-452.
ZHAO M Y, SUN S C. The nutritional value of five strains of microalgae in larval culture of puffer *Takifugu rubripes* [J]. *Fisheries Science*, 2007, 26(8): 449-452.
- [8] BECKER E W. *Microalgae for human and animal nutrition* [M]//RICHMOND A, HU Q. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*. 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2013: 461-503.
- [9] PLANAS M, SILVA C, QUINTAS P, et al. Ongrowing and enhancement of n-3 HUFA profile in adult *Artemia*: short- vs long-time enrichment [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2017, 29(3): 1409-1420.
- [10] EVJEMO J O, COUTTEAU P, OLSEN Y, et al. The stability of docosahexaenoic acid in two *Artemia* species following enrichment and subsequent starvation [J]. *Aquaculture*, 1997, 155(1/4): 135-148.
- [11] 过世东. *水产饲料生产学* [M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 351-353.
GUO S D. *Aquatic feed production* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2004: 351-353.
- [12] 陆建学,林听听,黄艳青,等. 南极大磷虾粉对卤虫脂肪酸和氨基酸的营养强化作用[J]. *生态学杂志*, 2013, 32(6): 1563-1570.
LU J X, LIN T T, HUANG Y Q, et al. Nutrient enrichment effect of Antarctic krill (*Euphausia superba*) powder on the fatty acid and amino acid compositions in *Artemia* nauplii [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2013, 32(6): 1563-1570.
- [13] 张跃群,陈爱华,张雨,等. 微藻营养强化对卤虫生长和营养成分的影响[J]. *中国农业大学学报*, 2018, 23(8): 77-84.
ZHANG Y Q, CHEN A H, ZHANG Y, et al. Effects of microalgae on the growth and nutrient enrichment of

- cultured *Artemia* [J]. Journal of China Agricultural University, 2018, 23(8): 77-84.
- [14] 黄旭雄, 王瑞, 吕耀平, 等. 不同强化饵料对卤虫必需脂肪酸组成的影响[J]. 水产科学, 2005, 24(10): 1-4.
- HUANG X X, WANG R, LYU Y P, et al. The effects of enrichments on essential fatty acids of cultured *Artemia* [J]. Fisheries Science, 2005, 24(10): 1-4.
- [15] SUI L Y, WILLE M, CHENG Y X, et al. The effect of dietary n-3 HUFA levels and DHA/EPA ratios on growth, survival and osmotic stress tolerance of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* larvae[J]. Aquaculture, 2007, 273(1): 139-150.

Optimal conditions and effects of high-density and short-term nutritional enrichment of *Artemia* nauplii with microalgae and *Schizochytrium aggregatum*

GAO Meirong¹, DENG Honggang¹, XING Mingwei¹, JIA Jing^{2,3}, ZHOU Guanghang^{2,3}, LONG Feiping^{2,3}, WU Xingyu^{2,3}, WANG Pian^{2,3}, SUI Liying¹

(1. Asia Regional *Artemia* Reference Center, College of Marine and Environmental Sciences, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China; 2. SDIC Biotechnology Investment Co., Ltd, Beijing 100034, China; 3. Beijing Key Laboratory of Microalga Bioenergy and Bioresource, Beijing 100142, China)

Abstract: Short-term *Artemia* enrichment is an efficient approach for improving the desired nutritional value of live feed *Artemia* nauplii. To investigate the optimal enrichment conditions, newly-hatched *Artemia* nauplii were enriched with commercially produced dry powder of microalgae *Phaeodactylum tricornutum* and *Isochrysis zhanjiangensis*, and fungus *Schizochytrium aggregatum* in this study. And the n-3 HUFA enrichment with the above products was compared with two commercially important *Artemia* strains from Great Salt Lake, USA (GSL) and Aral Lake, Uzbekistan. Higher *Artemia* survival percentages (85%–90%) were obtained when *Artemia* nauplii were enriched with *I. zhanjiangensis* under the following conditions: enrichment dose (0.05, 0.1, 0.15 and 0.2 g/L), enrichment duration (12, 18 and 24 h) and *Artemia* density (150, 200 and 250 ind./mL). And the individual body length and total biomass of *Artemia* increased with prolonged duration and increased dose. Considering the *Artemia* size preference and easy operation in the hatchery, the optimal enrichment parameters were proposed with *Artemia* nauplii density of 150–200 ind./mL, enrichment dose of 0.1–0.2 g/L, and enrichment duration of 12–24 h. Fatty acid analysis showed that fatty acid profile of the enriched *Artemia* was closely related to the enrichment agent and *Artemia* strains. For GSL *Artemia*, *P. tricornutum* and *I. zhanjiangensis* enrichment remarkably increased the EPA contents (7.39 and 3.20 mg/g dw, respectively) in *Artemia* when compared with newly-hatched *Artemia* nauplii (1.63 mg/g dw); whilst for Aral Lake *Artemia*, slight increase of EPA content could be observed between the enriched-*Artemia* (17.59 mg/g dw and 17.26 mg/g dw, respectively) and newly-hatched *Artemia* nauplii (14.35 mg/g dw), showing that the enrichment effect closely linked to the original EPA content of *Artemia* strains. On the other hand, the DHA content in two *Artemia* strains did not show remarkable improvement when enriched with microalgae, but *S. aggregatum* enrichment remarkably improved the DHA content of Aral Lake *Artemia* (2.31 mg/g dw), which should be attributed by the high DHA content of *S. aggregatum* (115 mg/g dw). The results of this study will support development of microalgae enrichment agent and application of *Artemia* nutrition enrichment in hatcheries.

Key words: microalgae; *Schizochytrium aggregatum*; *Artemia*; nutritional enrichment; n-3 HUFA