

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21120051302189

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

利用微藻营养强化时褶皱臂尾轮虫的摄食
和脂肪酸组成研究

Research on Feeding and Fatty Acid Composition of
Brachionus plicatilis enriched with microalgae

李 磊

指导教师姓名: 朱小明 副教授

专业名称: 海洋生物学

论文提交日期: 2008 年 07 月

论文答辩日期: 2008 年 07 月

学位授予日期: 2008 年 09 月

答辩委员会主席: 黄凌风教授

评 阅 人: 王初升研究员、郭丰副教授

2008 年 07 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要 (中文)	1
摘要 (英文)	2
第一章 绪论	4
1 褶皱臂尾轮虫及其在水产养殖动物育苗中的应用	4
1.1 褶皱臂尾轮虫的生物学特性	4
1.2 褶皱臂尾轮虫在水产养殖动物育苗中的应用	6
1.3 褶皱臂尾轮虫的大规模培养技术	7
1.3.1 批次性培养	8
1.3.2 半连续培养	8
1.3.3 连续性培养	9
2 轮虫的摄食机制研究进展	10
2.1 轮虫的摄食机制	10
2.2 饵料密度对轮虫滤水率和摄食率的影响	11
3 轮虫的营养强化研究进展	13
3.1 水产动物早期幼体发育对营养物质的需求	13
3.2 轮虫的营养强化	16
3.3 轮虫的营养强化方式	19
3.3.1 利用海洋微藻强化轮虫	19
3.3.2 利用强化剂强化轮虫	20
4 研究目的与意义	21
第二章 营养强化时轮虫对饵料微藻的摄食研究	22
1 材料和方法	22
1.1 实验材料	22
1.1.1 轮虫的来源和培养	22

1.1.2 藻类的来源和培养	22
1.2 实验方法	23
1.2.1 几种藻类细胞的生物量测定	23
1.2.2 轮虫对不同密度梯度小球藻的摄食实验	23
1.2.3 营养强化时轮虫对几种藻类的摄食实验	24
1.2.4 摄食率和滤水率的计算	24
1.2.5 轮虫对混合藻液中饵料的选食率和选择性指数的计算	25
1.2.6 数据分析	25
2 结果	25
2.1 几种藻类细胞的生物量	25
2.2 轮虫对不同密度梯度的小球藻摄食	26
2.3 轮虫对单种微藻的摄食	27
2.4 轮虫对混合微藻的摄食	28
3 讨论	31
3.1 轮虫对不同密度梯度小球藻的摄食	31
3.2 轮虫对单种微藻的摄食	32
3.3 轮虫对混合微藻的摄食	33
第三章 营养强化对轮虫脂肪酸组成的影响研究	36
1 材料与amp;方法	36
1.1 实验材料	36
1.1.1 轮虫的来源和培养	36
1.1.2 藻类的来源和培养	36
1.1.3 小球藻粉、螺旋藻粉、裂壶藻粉和隐甲藻粉	36
1.1.4 脂肪酸甲酯标准品	36
1.2 利用不同藻类对轮虫营养强化	37
1.3 利用小球藻粉、螺旋藻粉、裂壶藻粉和隐甲藻粉对轮虫营养强化	37
1.4 脂肪酸分析	37
1.4.1 样品的水解和脂肪酸甲酯的制备	37

1.4.2 脂肪酸甲酯的气相色谱分析·····	38
1.4.3 脂肪酸甲酯的定性分析和定量计算·····	38
2 结果 ·····	39
2.1 微藻和几种藻粉的脂肪酸组成·····	39
2.2 微藻和藻粉强化后轮虫的脂肪酸组成·····	40
3 讨论 ·····	42
3.1 几种饵料微藻的脂肪酸组成·····	42
3.2 单种微藻和混合微藻对轮虫的强化效果·····	43
3.3 几种藻粉对轮虫的强化效果·····	45
3.3.1 小球藻粉和螺旋藻粉·····	45
3.3.2 裂壶藻粉和隐甲藻粉·····	45
参考文献 ·····	47
致谢 ·····	58

Contents

Abstract (in Chinese)1

Abstract (in English)2

Chapter 1. Introduction.....4

1 *Brachionus plicatilis* and their application in altricial larvae in aquaculture.....4

1.1 Biological characteristics of *Brachionus plicatilis*.....4

1.2 Application of *Brachionus plicatilis* in altricial larvae in aquaculture.....6

1.3 Mass culture of *Brachionus plicatilis*.....7

1.3.1 Batch cultures.....8

1.3.2 Semicontinuous cultures.....8

1.3.3 Continuous cultures.....9

2 Research progress on feeding strategy of rotifer.....10

2.1 Feeding strategy of rotifer.....10

2.2 Influence of food density on the filtration and ingestion rate of rotifer.....11

3 Research progress on enrichment of rotifer.....13

3.1 Nutrition requirement of altricial larvae.....13

3.2 Enrichment of rotifer.....16

3.3 Enrichment procedure of rotifer.....19

3.3.1 Enrich rotifer with marine microalgae.....19

3.3.2 Enrich rotifer with enrichments.....20

4 Objective and significance of the research.....21

Chapter 2. Feeding of rotifer enriched with microalgae.....22

1 Material and method.....22

1.1 Experimental material.....22

1.1.1	Experimental rotifer and their culture	22
1.1.2	Experimental algae and their culture	22
1.2	Experimental method	23
1.2.1	Measurement of the microalgae biomass	23
1.2.2	Feeding experiment of rotifer on <i>Chlorella</i> sp. at different cell density	23
1.2.3	Feeding experiment of rotifer on single and mixed microalgae	24
1.2.4	Calculation of filtration and ingestion rate of rotifer	24
1.2.5	Calculation of selectivity and select exponent of rotifer fed with mixed microalgae	25
1.2.6	Data analysis	25
2	Results	25
2.1	Microalgae biomass	25
2.2	Feeding of rotifer on <i>Chlorella</i> sp. at different cell density	26
2.3	Feeding of rotifer on single microalgae	27
2.4	Feeding of rotifer on mixed microalgae	28
3	Discussion	31
3.1	Feeding of rotifer on <i>Chlorella</i> sp. at different cell density	31
3.2	Feeding of rotifer on single microalgae	32
3.3	Feeding of rotifer on mixed microalgae	33
Chapter 3. Influence of enrichment on fatty acids composition of rotifer		36
1	Material and method	36
1.1	Experimental material	36
1.1.1	Experimental rotifer and their culture	26
1.1.2	Experimental algae and their culture	26
1.1.3	<i>Chlorella</i> powder/ <i>Spirulina</i> powder/ <i>Schizochytrium</i> powder/ <i>Cryptocodinium</i> powder	36

1.1.4 Standard of fatty acid methyl esters.....	36
1.2 Rotifer enriched with different types of microalgae.....	37
1.3 Rotifer enriched with algae powder.....	37
1.4 Fatty acid analysis.....	37
1.4.1 Hydrolyzation of sample and preparation of fatty acid methyl esters.....	37
1.4.2 GC analyzation of fatty acid methyl esters.....	38
1.4.3 Qualitative analysis and quantitative calculation of fatty acid methyl esters	38
2 Results.....	39
2.1 Fatty acid composition of microalgae and algae powder.....	39
2.2 Fatty acid composition of rotifer enriched with microalgae and algae powder.....	40
3 Discussion.....	42
3.1 Fatty acid composition of microalgae.....	42
3.2 Enrichment efficiency of single and mixed microalgae on rotifer.....	43
3.3 Enrichment efficiency of algae powder on rotifer.....	45
3.3.1 <i>Chlorella</i> powder and <i>Spirulina</i> powder.....	45
3.3.2 <i>Schizochytrium</i> powder and <i>Cryptocodinium</i> powder.....	45
References.....	47
Acknowledgement.....	58

摘要

褶皱臂尾轮虫已被广泛用作海水养殖动物幼体的开口饵料,其大规模培育技术日趋成熟,然而其作为幼体饵料存在着固有的营养缺陷,尤其高不饱和脂肪酸(HUFAs)含量较低,如ARA(C20:4n-6)、EPA(C20:5n-3)和DHA(C22:6n-3)等几种必需脂肪酸(EFAs),对其进行HUFA营养强化具有重要意义。本研究采用小球藻、牟氏角毛藻和球等鞭金藻对轮虫进行营养强化,从轮虫摄食和生化成分分析等两方面探讨单种微藻和混合微藻对轮虫营养强化的效果,以期为更有效地利用微藻对轮虫进行营养强化提供参考。主要结果如下:

1. 研究了轮虫以单种微藻和混合微藻培养时滤水率和摄食率的动态变化,结果表明微藻浓度、微藻种类和培养时间均对轮虫的滤水率和摄食率有显著影响。轮虫对几种单种微藻的滤水率和摄食率均随培养时间的延长而下降,在实验条件下,6h内轮虫对三种微藻的滤水率大小顺序为:小球藻>球等鞭金藻>牟氏角毛藻,在全部实验时间(12h)内轮虫对三种微藻的滤水率大小顺序则为:球等鞭金藻>小球藻>牟氏角毛藻。轮虫在混合微藻中的选择顺序为:球等鞭金藻>小球藻>牟氏角毛藻。

2. 利用气相色谱测定了三种微藻和利用单种微藻及混合微藻强化后的轮虫的脂肪酸组成,结果表明短链和低不饱和的脂肪酸在轮虫中的组成含量相对稳定,而长链和高不饱和脂肪酸的组成含量主要由其摄食的饵料决定。小球藻、牟氏角毛藻和球等鞭金藻因为它们分别具有的较高的EPA和DHA含量,均适合作为轮虫的强化饵料。利用球等鞭金藻和小球藻混合饵料强化后的轮虫三种必需脂肪酸(EPA、DHA和ARA)含量较高,达到干重的1.0509%,而且DHA/EPA和EPA/ARA的比值分别约为0.7:1和5.4:1,比较适合作为海洋动物幼体的开口饵料。

3. 测定了几种藻粉和利用藻粉强化后的轮虫的脂肪酸组成,结果表明小球藻粉和螺旋藻粉不适合用于强化轮虫的HUFAs,裂壶藻粉和隐甲藻粉DHA含量较高,强化酵母培养的轮虫时需要注意与EPA含量较高的饵料配合使用,以满足不同海洋动物幼体对HUFA种类和含量平衡的需要。

关键词: 褶皱臂尾轮虫; 海洋微藻; 藻粉; 滤水率; 摄食率; 脂肪酸; 营养强化

Abstract

The rotifer *Brachionus plicatilis* can be mass cultivated and is commonly used for first feeding of altricial larvae in mariculture. But it is low in the HUFAs such as ARA(C20:4n-6), EPA(C20:5n-3) and DHA(C22:6n-3) which are essential fatty acids for larviculture of fish and crustaceans. *Chlorella* sp., *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis galbana* were cultured as foods of the rotifers. The rotifer *Brachionus plicatilis* were enriched with single or mixed microalgal species to learn how to enhance the nutritional value of rotifer efficiently. The main results are presented as follows:

1. The dynamics of filtration and ingestion rates of *Brachionus plicatilis* fed on single or mixed microalgal species was recorded. The filtration and ingestion rates of the rotifers were influenced significantly by the microalgal concentration, microalgal quality and cultural duration. The filtration and ingestion rates of the rotifers decreased with their increasing cultural duration. Under the experimental condition, within 6 hours, the sequence of the filtration rates of the rotifers on the three types of microalgae as follows: *Chlorella* sp. >*Isochrysis galbana* >*Chaetoceros muelleri*; while within the whole experimental times (12 hours), the sequence of the filtration rates of the rotifers on the three types of microalgae as follows: *Isochrysis galbana* >*Chlorella* sp. >*Chaetoceros muelleri*. The sequence of the selectivity of rotifers fed on the mixed microalgae as follows: *Isochrysis galbana* >*Chlorella* sp. >*Chaetoceros muelleri*.

2. The fatty acid composition of three types of microalgae and the rotifers fed with single and mixed microalgal species were examined using gas chromatography (GC) technique. The composition and the content of short-chain and low unsaturated fatty acids were steady comparatively, while the composition and the content of long-chain and highly unsaturated fatty acids in rotifers were greatly affected by that in the diet. The result indicated that *Chlorella* sp., *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis galbana* are all suitable to enrich rotifers, which contain high level of EPA and DHA respectively. In addition, the contents of the three types of essential fatty

acids (ARA, EPA and DHA) in rotifers enriched by mixed diet of *Isochrysis galbana* and *Chlorella* sp. was 1.0509% of dry weight, and the ratio of DHA/EPA and EPA/ARA of rotifers was about 0.7/1 and 5.4/1, respectively. On the basis of these results, the rotifers enriched by mixed diet of *Isochrysis galbana* and *Chlorella* sp. were more suitable as first feeding for marine larvae than the other diet.

3. The fatty acid composition of four types of algae powder and the rotifers fed with these algal powders were examined. The result indicated that the *Chlorella* powder and the *Spirulina* powder are not suitable to enrich rotifers to improve the content of HUFAs. The *Schizochytrium* powder and the *Cryptocodinium* powder contain high level of DHA, however they should mixed with other diet that contain high level of EPA when they were used for enriching rotifers cultured only by yeast.

Keywords: *Brachionus plicatilis*; marine microalgae; algae powder; filtration rate; ingestion rate; fatty acids; enrichment

第一章 绪论

1 褶皱臂尾轮虫及其在水产养殖动物育苗中的应用

1.1 褶皱臂尾轮虫的生物学特性

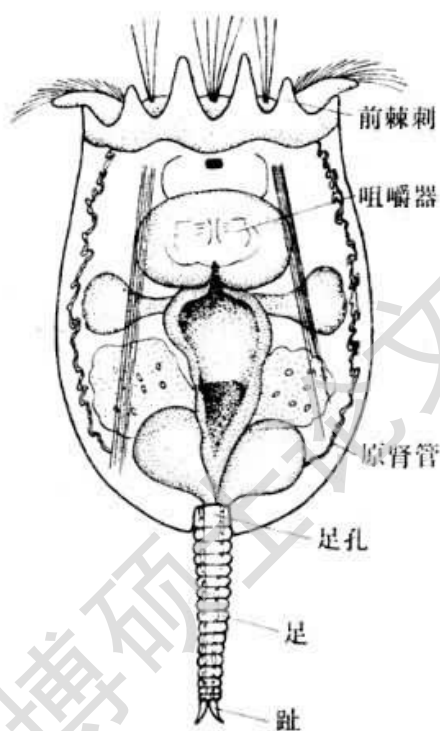


图1.1 褶皱臂尾轮虫的形态

Fig 1.1 *Brachionus plicatilis*

褶皱臂尾轮虫 (*Brachionus plicatilis* O. F. Müller) 是一种微型浮游动物，隶属轮虫动物门 (Rotatoria or Rotifera)、单巢纲 (Monogononta)、游泳目 (Ploima) 臂尾轮虫科 (Brachionidae)、臂尾轮虫属 (*Brachionus*)^[1]。褶皱臂尾轮虫的被甲长约 196-250 μm ，宽约 150-202 μm ^[2]，偏好有机质含量较高的水体。

褶皱臂尾轮虫对环境的适应能力很强，分布在由暖温带到热带广大地区的半咸水和海水水域，生长繁殖适宜的环境因子参数如下^[3-6]：1) 适宜盐度为 10-30，最适盐度为 15-25，对盐度的适应能力较强，但对盐度的变化耐力较低；2) 适宜温度 25-35 $^{\circ}\text{C}$ ，最适温度 30-35，5 $^{\circ}\text{C}$ 是其存活的最低温度，10 $^{\circ}\text{C}$ 是其繁殖的临界低温；3) 适宜 pH 范围为 6-9，最适 pH 范围为 8.0-8.2，在 pH 为 5-10 的范围内均能正常生长繁殖；4) 适宜的光照强度 4 400-10 000 勒克斯；5) 溶氧量在 2 mg

L⁻¹时繁殖良好，培育过程中应维持在 1.5 mg L⁻¹ 以上；6) 培养用水的化学耗氧量在 20-100 μl L⁻¹ 为宜；7) 非离子氨是褶皱臂尾轮虫生长繁殖的限制因素，它的浓度不宜超过 1 mg L⁻¹。

褶皱臂尾轮虫为雌雄异体，一般常见的是雌性，当环境因子改变时会出现雄性个体。雌性臂尾轮虫身体的前端具有一个由纤毛组成的特殊区域，叫做轮盘，或称头冠 (Corona)。其上具有纤毛环，纤毛的旋动或摆动产生水流，借以摄食和运动。头冠之后的躯干部被一透明、光滑的背甲所包围，背甲前缘通常具有六个棘刺，中间的一对棘刺与其他两对棘刺基本等长或稍长。背甲后部正中有一开口，背面观略呈正方形、腹面观略呈三角形，轮虫尾部即从此孔伸出。轮虫的尾部很长，上有环状纹、后端有一对铗状趾 (toc)。生在尾基部的一对吸着腺一直通到铗状趾，轮虫就是利用其分泌的粘液能随时附着到其他物体上^[7]。

褶皱臂尾轮虫主要依赖头冠纤毛的转动作旋转式或螺旋式运动，尾部虽然不是主要运动器官，但是它的摆动可以起到辅助运动的作用。轮虫的运动速度一般 <0.02 cm s⁻¹，运动缓慢。褶皱臂尾轮虫通过纤毛向同一方向的转动使水形成旋涡，适口的细菌、浮游藻类、小型的原生动物和有机碎屑等便被摄食进入口中^[2, 8]。Hino et al (1980) 测定轮虫摄食饵料的最大直径为22-30 μm，伊藤 (1964) 则认为以10-12 μm为好，一般来说，轮虫的饵料大小宜在25 μm以下，尤以15 μm以下最为理想^[5]。

褶皱臂尾轮虫的生长繁殖是孤雌生殖和有性生殖交替进行。当环境条件适宜时主要进行孤雌生殖，休眠卵发育成双倍体的雌性个体，经有丝分裂产生双倍体的不需精卵 (亦称夏卵)。不需精卵的壳薄而光滑，长径 96-130 μm，短径 48-56 μm^[2]，成熟后不需受精就能发育成为雌体。当环境条件不适或变化剧烈时，种群出现混交雌体，经减数分裂产生单倍体的需精卵。需精卵的个体较小 (约为夏卵的一半左右)、数目较多，未受精的需精卵发育成雄体，受精的需精卵产生休眠卵 (亦称冬卵)。休眠卵的壳厚，呈橘黄色，可以抵御外界恶劣的环境条件。当环境条件适宜时，休眠卵又可以发育成双倍体的雌性个体而进入孤雌生殖世代。轮虫能够进行有性生殖产生休眠卵度过不良环境，对维持其种族的生存、繁衍具有重大意义。

众所周知，轮虫是形态变异极大的浮游动物，即使同一品系也有大小和形状

的变化,即多形性(polymorphism)。褶皱臂尾轮虫同样存在个体大小不同的变异,Snell et al^[9]调查了13个品系褶皱臂尾轮虫的个体大小,被甲长度范围123-292 μm ,宽度范围114-199 μm ,个体大小差异很大。Fukusho^[10]发现具有不同大小的轮虫品系,其种群增长所需的最适温度和食物类型可能不同,产于日本的小品系褶皱臂尾轮虫在夏季温度较高时为优势种群,而大品系褶皱臂尾轮虫在冬季为优势种群。以被甲和后棘刺形状为标准,褶皱臂尾轮虫通常分为小S型(被甲呈球形,长120-150 μm ,适宜温度23-27 $^{\circ}\text{C}$)、L型(*Brachionus plicatilis typicus*,被甲呈长圆型,被甲长200-360 μm ,适于10 $^{\circ}\text{C}$ 以上水温,最适水温18-25 $^{\circ}\text{C}$)、S型(*Brachionus plicatilis rotundiformis*,被甲呈椭圆型,长150-220 μm ,适于20 $^{\circ}\text{C}$ 以上水温,最适水温25-35 $^{\circ}\text{C}$)^[2]。此外,王培等^[3]在培养褶皱臂尾轮虫的过程中发现,温度对其形态变异有显著作用,其次是饵料种类和增殖密度影响。Snell et al^[9]研究发现,在特定情况下,饵料种类和盐度分别诱导轮虫被甲长度产生了15%和11%的变异。轮虫的不同品系及其个体大小变异对生产应用具有实际意义,生产中应根据鱼苗的开口口径,选择合适的褶皱臂尾轮虫种群,控制在一定的条件下培养。

1.2 褶皱臂尾轮虫在水产养殖动物育苗中的应用

褶皱臂尾轮虫是一种重要的饵料生物,因其大小适中,运动缓慢,繁殖迅速,易于培养,成为海水仔鱼和蟹类幼体的开口饵料,在水产育苗中具有重要地位^[3-7]。据统计,现在国外海水育苗生产中,已有60种鱼类,18种甲壳动物使用褶皱臂尾轮虫作为开口饵料^[11-12],轮虫的大规模培养也就成为开展海洋鱼蟹类的人工育苗的前提条件。早期轮虫的大规模培养采用海产小球藻(*Chlorella sp.*)等微藻进行,微藻的培养需要耗费大量的人力和物力,在一定程度上限制了轮虫的规模化培养^[13]。后来随着酵母培养轮虫技术的长足发展,极大地促进了轮虫的规模化培养,进而推动了水产养殖业的发展。然而,随后发现只用酵母轮虫培养仔鱼时,经常出现仔鱼的大量死亡;而使用酵母和海产小球藻混合培养轮虫,或先用酵母培养,在投喂仔鱼之前,再用海水小球藻培养,能防止仔鱼的大量死亡^[14]。研究表明酵母轮虫体内所含的n-3PUFA(n-3系列高不饱和脂肪酸)不能满足苗种正常生长发育的需要,而微藻中所含有的n-3PUFA经轮虫传递到苗种体内,满足了苗种的营养需求^[13-15],轮虫的营养强化技术逐渐发展起来。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库