

实验微粒饲料中花生四烯酸含量对牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 仔稚鱼生长、 存活的影响*

刘镜恪[†] 陈晓琳[‡] 李岿然[†] 徐世宏[†]

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

[†](中国科学院海洋研究所 青岛 266071; 中国科学院研究生院 北京 100039)

[‡](中国海洋大学生命学院 青岛 266003)

提要 采用花生四烯酸即廿碳四烯酸(AA, 20: 4n-6)含量梯度法, 制备了四种 n-3HUFA 含量相等、DHA/EPA 比例相同、AA 含量分别为 0.06%、1.00%、1.5%、2.0% 的实验微粒饲料, 进行了 AA 的不同含量对牙鲆仔稚鱼生长、存活、体内相关成分以及对外部压力耐受性的影响研究。26 天的养殖试验结果表明, 当牙鲆仔稚鱼实验微粒饲料中 AA 的含量为 1.5% 时, 牙鲆仔稚鱼的生长、存活以及对不同压力的耐受性都达到最佳。养殖试验结束后, 对稚鱼体内相关成分的分析结果表明, 稚鱼体内 AA 的含量随着实验微粒饲料中 AA 含量的增加而增加。

关键词 实验微粒饲料, 花生四烯酸, 牙鲆仔稚鱼

中图分类号 S963

近年来国内外的研究证实(刘镜恪等, 2002; Bisbal *et al.*, 1991), n-3 系列高度不饱和脂肪酸(n-3HUFA)是海水仔稚鱼的必需脂肪酸, 海水仔稚鱼自身不能合成这些必需脂肪酸, 只能从活饵料或投喂饲料中摄取, 活饵料或饲料中 n-3HUFA 的数量和种类, 会直接影响海水仔稚鱼的生长速度、成活率、应激能力和体内相关成分等, 其中以廿二碳六烯酸(DHA)和廿碳五烯酸(EPA)尤为重要(Koven *et al.*, 1990; Salhi *et al.*, 1994; Bisbal *et al.*, 1991; Howell *et al.*, 1991; Dhert *et al.*, 1993; Izquierdo *et al.*, 1989)。而 n-6 系列高度不饱和脂肪酸(n-6HUFA)在海水鱼的营养学研究中尚未引起足够的重视(Bell *et al.*, 1995; Castell *et al.*, 1994; Zheng *et al.*, 1996)。国内的有关研究尚未见报道, 国外近年来的研究证实, n-6HUFA 与 n-3HUFA 一样, 也是海水仔稚鱼的必需脂肪酸, 其中以花生四烯酸即廿碳四烯酸(AA, 20: 4n-6)尤为重要(Castell *et al.*, 1994)。Castell 等(1994)研究

了 AA 对大菱鲆(*Scophthalmus maximus*) 幼鱼生长、存活的影响。迄今, 国外有关 AA 对海水仔稚鱼生长、存活影响的研究亦所见甚少(Castell *et al.*, 1994)。本研究以牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) 仔稚鱼为研究对象, 采用 AA 含量梯度法探讨实验微粒饲料中 AA 的不同含量对牙鲆仔稚鱼生长、存活的影响, 为微粒饲料中 AA 的适宜添加量提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 四种实验微粒饲料的组成及其制备

四种微粒饲料的组成为(%、重量): 特种鱼粉 74(干重计)、混合油 10、复合维生素 5.4、复合矿物质 4.5、诱食剂 3.0、粘合剂 3.1。10% 的混合油由相同含量的鱼油、梯度含量的 AA 油和大豆油组成, AA 油由武汉烯王生物工程有限公司提供, 含量为 79.64%。其中 AA 含量为 0.06% 的实验微粒饲料中添加的混合油, 由鱼油和大豆油组

* 国家自然科学基金资助项目, 30371114 号。刘镜恪, 研究员, E-mail: liujk@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2004-07-07, 收修稿日期: 2005-04-15

成, 不含 AA 油, 故该实验微粒饲料可视为对照饲料。

四种实验微颗粒饲料的制备参考国外的海鱼微粒饲料配方及实验室制备程序, 具体制备程序如下:

(1) 制备五种预混料, 分别为油的预混料、水溶性维生素预混料(不含维生素 C)、脂溶性维生素预混料、诱食剂预混料、矿物质预混料, 低温保存储备用。

(2) 将诱食剂预混料、矿物质预混料与特种鱼粉混合, 搅拌均匀。

(3) 向(2)中所得的混合物中加入维生素 C, 搅拌均匀。

(4) 向(3)中所得的混合物中加入含有抗氧化、脂溶性维生素的油的预混料, 搅拌均匀。

(5) 向(4)中所得的混合物中加入粘合剂, 制成条状饲料。

(6) 将条状饲料放入温度维持在 38—40℃之间的烘箱内烘干。

(7) 将烘干的条状饲料用超微粉碎机粉碎成微粒饲料。

(8) 将微粒饲料过样品筛, 筛选出 150 μ m、250 μ m 和 350 μ m 三种粒径的微径饲料。

1.2 四组仔稚鱼的培育

同批亲鱼一次性牙鲆受精卵取自青岛市黄岛区“连三岛海珍品苗种繁殖中心”, 试验仔鱼分为四组, 每组 2 缸, 每缸加入过滤海水约 60L, 各放置仔鱼 200 尾, 鱼缸由玻璃钢材料制成的直径为 0.4m、高 0.6m 的圆柱体。育苗用水经室外蓄水池沉淀, 二级砂滤池过滤, 进育苗缸前再经滤袋过滤, 鱼缸用遮光黑塑料布调节光照, 避免阳光直射

和夜晚灯光照射。试验开始前, 另取同批仔鱼 40 尾, 测量其全长, 平均全长为 4—5mm。仔鱼孵化后第 10 天开始分别投喂四种微粒饲料。试验开始于 2004 年 5 月 24 日, 结束于同年 6 月 18 日, 历时 26 天。试验期间, 水温为 17.5—21.5℃, 海水 pH 为 8.2—8.3, 盐度为 33, 每个缸内各放置一个气石, 连续充气, 每日每缸换水 1/2—4/5, 并及时清除缸底污物和缸壁残饵。为提高仔鱼的成活率, 每天 13:00 和 17:00 向仔鱼缸内各添加一次单胞藻培养的轮虫(或卤虫), 添加后缸内轮虫(或卤虫)的密度约为 2 个/ml。

1.3 活力测试

养殖试验结束后, 进行两个活力测试试验来检测稚鱼对外部压力的耐受性。

(1) 缺氧测试: 用鱼网从每个试验组中随机取出稚鱼 20 尾, 共 4 组, 分别在室温为 23℃的空气中暴露 20s 后, 置于 4 个充氧的盛有 30L 过滤海水的养殖容器中, 24h 后计算成活率。

(2) 高盐度测试: 用鱼网从每个试验组中随机取出稚鱼 20 尾, 共 4 组, 分别置于 4 个盐度均为 46、充氧的盛有 30L 过滤海水的养殖容器中, 24h 后计算成活率。

1.4 稚鱼体内各种脂肪酸的化学分析

养殖试验结束后, 四组稚鱼体内各种脂肪酸在总脂肪酸中的百分含量由中国海洋大学药物研究所采用气相色谱法进行分析测定。

2 结果

2.1 实验微粒饲料中 AA 的不同含量对牙鲆仔稚鱼生长、存活的影响

26 天的养殖试验结束后, 有关试验结果列于表 1。

表 1 养殖试验结束后 4 组试验稚鱼的全长和成活率
Tab. 1 Final total length and survival rate of larval fish in four groups

试验组	试验缸	平均全长(mm)	成活率(%)	平均成活率(%)
1	1A	11.83±1.04	30.50	35.75±2.40
	1B		41.00	
2	2A	12.70±0.96	38.00	33.50±2.36
	2B		29.00	
3	3A	13.58±1.08	42.00	44.75±2.49
	3B		47.50	
4	4A	12.50±0.79	32.50	32.00±2.33
	4B		31.50	

注: 试验仔鱼 200 尾/缸, 初始平均全长 4—5mm

2.2 四组试验稚鱼体内各种脂肪酸在总脂肪酸中的百分含量的化学分析

养殖试验结束后,采用气相色谱法进行分析测定,结果列于表 2。

表 2 稚鱼体内各种脂肪酸在总脂肪酸中的重量百分含量

Tab. 2 Contents of every fatty acid of total fatty acids in larvae

脂肪酸	试验组 1	试验组 2	试验组 3	试验组 4
14 0	0.93	0.90	0.88	0.95
16 0	19.47	18.36	17.79	16.76
16 1n-7	5.12	5.15	5.78	4.58
18 0	12.63	10.98	11.93	11.60
18 1n-9	33.12	27.40	36.01	33.12
18 2n-6	5.63	5.33	6.17	6.34
20 4n-6	4.96	5.53	6.10	6.38
20 5n-3	2.87	3.10	3.29	3.30
22 6n-3	0.25	0.27	0.29	0.29

2.3 四组试验稚鱼的活力测试

养殖试验结束后,进行了四组试验稚鱼的活力测试,结果列于表 3。

表 3 活力测试后稚鱼的成活率

Tab. 3 Survival rate of larval fish after the activity test

测试类型	试验组	初始稚鱼	结束稚鱼	成活率(%)
		尾数	尾数	
缺氧测试	1	20	19	95
	2	20	7	35
	3	20	20	100
	4	20	17	85
高盐度测试	1	20	8	40
	2	20	7	35
	3	20	19	95
	4	20	13	65

2.4 实验结果的统计分析

对表 1 中各组仔稚鱼平均全长的方差分析结果表明,各组仔稚鱼平均全长间有显著性差异;进一步的 Duncan 多重比较结果表明第三组与其他组间差异显著,其他组间差异无显著性。各实验组仔稚鱼平均全长的方差分析结果列于表 4,各

实验组间仔稚鱼平均全长的多重比较结果列于表 5。

表 4 各实验组仔稚鱼平均全长的方差分析

Tab. 4 Analysis of variance of mean total length of larval fish in group 1—4

差异源	SS	df	MS	F	P-value
组间	15.689	3	5.229667	5.498738	0.00325
组内	34.238	36	0.951067		
总计	49.927	39			

表 5 各实验组间仔稚鱼平均全长的多重比较

Tab. 5 Duncan multiple range test of mean total length of larval fish in group 1—4

实验组	3	2	4
1	1.75 ^{**}	0.87	0.67
4	1.08 [*]	0.20	
2	0.88 [*]		

* * $P \leq 0.01$, * $P \leq 0.05$

各实验组平均成活率经 χ^2 检验(chi-square test)结果表明,第三组与其他各组平均成活率间有显著性差异,其他组间差异无显著性。各实验组间平均成活率的比较结果列于表 6。

表 6 各实验组间平均成活率的比较

Tab. 6 A comparison of mean survival rate of larval fish in group 1—4

实验组	2	3	4
1	0.447	6.736 ^{**}	1.256
2		10.628 ^{**}	0.204
3			13.748 ^{**}

注:表中数据为两成活率比较的 χ^2 值,* * $P \leq 0.01$

综合平均全长和平均成活率两项指标的统计分析结果,表明实验组 3 仔稚鱼的平均全长和平均成活率均高于其他实验组。

表 2 中,试验组稚鱼体内 AA 在总脂肪酸中的百分含量随着试验组 1 到试验组 4 而逐渐增大(分别为 4.96%、5.53%、6.10% 和 6.38%)。DHA、EPA 的含量在各个试验组中没有明显差异。

表 3 中,缺氧测试的结果是试验组 3 中稚鱼的成活率最高(100%),这表明该组仔稚鱼对缺氧压力的耐受性最强。高盐度测试的结果亦是试验组 3 中稚鱼的成活率最高(95%),表明该组稚鱼

对高盐度压力的耐受性最强。

3 讨论

Bessonart 等(1999)研究了微粒饲料中AA的含量对金头鲷(*Sparus aurata*)仔稚鱼生长、存活的影响。在该试验中,微粒饲料中AA的含量范围为0.1%—1.0%,2周后,金头鲷仔稚鱼的生长速度无明显差异,这可能是由于试验时间较短的缘故。3周后的试验结果表明,微粒饲料中AA的含量从0.1%提高到1.0%,明显地提高了仔稚鱼的生长速度和成活率。Zheng 等(1996)的研究结果表明,用AA含量为3.7%—7.6%强化卤虫(干重计)与用AA含量小于0.5%强化卤虫(干重计)培育的鳕鱼(*Gadus morhus*)仔稚鱼相比,前者仔稚鱼的成活率和生长速度均低于后者,这说明鳕鱼仔稚鱼对活饵料中AA的需要量不高,活饵料中AA的含量过高,对鳕鱼仔稚鱼的成活率和生长速度有不利影响。

本研究中作者以牙鲆仔稚鱼为研究对象,进一步探讨了微粒饲料中AA的不同含量对仔稚鱼生长、存活的影响。26天的养殖试验结果表明:在该试验条件下,当牙鲆仔稚鱼实验微粒饲料中AA的含量为1.5%时,牙鲆仔稚鱼的生长、存活以及对不同压力的耐受性都达到最佳。因此,在该试验条件下,牙鲆仔稚鱼微粒饲料中AA的最适含量应为1.5%左右。养殖试验结束后,对稚鱼体内相关成分的分析结果表明,仔稚鱼体内AA的含量随着实验微粒饲料中AA含量的增加而增加。本研究结果进一步证实了n-6HUFA中的AA如同n-3HUFA中的DHA和EPA,也是海水仔稚鱼的必需脂肪酸,对仔稚鱼的生长、存活有重要影响,应引起人们足够的重视。此外,从表1可以看出,在本项研究中用AA含量分别为0.06%和1.0%的微粒饲料培育的牙鲆仔稚鱼,养殖试验结束后,仔稚鱼的平均成活率分别为35.75%和33.50%,前者略高于后者,而且同一试验组的两个试验缸之间,仔稚鱼的成活率差异较大。产生这些不甚符合规律的结果是由于作者在试验过程中操作不当引起的,还是其他原因引起的?有待进一步深入研究。

参 考 文 献

刘镜恪,周利,雷霖霖,2002.海水仔稚鱼脂类营养研究进展.海洋与湖沼,33(4):446—452 [Liu J K,

Zhou L, Lei J L, 2002. Lipid nutrition in marine fish larvae: a review. Oceanologia et Limnologia Sinica, 33(4): 446—452]

Bell J G, Castell J, Tocher D R *et al.*, 1995. Effects of different dietary arachidonic acid: docosahexaenoic acid ratios on phospholipid fatty acid composition and prostaglandin production in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). Fish Physiol Biochem, 14: 139—151

Bessonart M, Izquierdo M S, Salhi M *et al.*, 1999. Effect of larval cod for arachidonic acid levels on the growth and survival of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae. Aquaculture, 179: 265—275

Bisbal G A, Bengtson D A, 1991. Effect of dietary (n-3) HUFA enrichment on survival and growth of summer flounder, *Paralichthys dentatus*, larvae. In: Lavens P, Jaspers E, Olleci F ed. larvi' 94 Fish & Crustacean Larviculture Symposium, Special Publication No. 15, European Aquaculture Society, Gent, Belgium, 23: 56—57

Castell J D, Bell J G, Tocher D R *et al.*, 1994. Effects of purified diets containing different combinations of arachidonic acid and docosahexaenoic acid on survival, growth and fatty acid composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture, 128: 315—333

Dhert P H, Lavens P, Sorgeloos P, 1993. A simple test for quality evaluation of culture fry of marine fish. Med Fac Landbouww Univ Gent, 57(4b): 2135—2142

Howell B R, Tzoumas T S, 1991. The nutritional value of Artemia nauplii for larval *Solea solea* (L.) with respect to their (n-3) HUFA content. In: Lavens P, Sorgeloos P, Jaspers E *et al.* ed. larvi' 94 Fish & Crustacean Larviculture Symposium, European Aquaculture Society, Gent, Belgium, Special Publication No. 15: 63—65

Izquierdo M S, Watanabe T, Takeuchi T *et al.*, 1989. Requirement of larval red seabream *Pagrus major* for essential fatty acids. Nippon Suisan Gakkaishi, 55(5): 859—867

Koven W M, Tandler A, Kissil G W *et al.*, 1990. The effect of dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids on growth, survival and swim bladder development in *Sparus aurata* larvae. Aquaculture, 91: 131—141

Salhi M, Izquierdo M S, Hernandez-Cruz C M *et al.*, 1994. Effect of lipid and n-3HUFA levels in microdiets on growth, survival and fatty acid composition of larval gilthead seabream (*Sparus aurata*). Aquaculture, 124: 275—282

Zheng F, Takeuchi T, Yoshida K *et al.*, 1996. Requirement of larval cod for arachidonic acid, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid using by their enriched *Artemia nauplii*. Nippon Suisan Gakkaishi, 62: 669—676

EFFECTS OF DIFFERENT CONTENTS OF ARACHIDONIC ACID IN EXPERIMENTAL MICRODIETS ON GROWTH AND SURVIVAL OF LARVAL JAPANESE FLOUNDER *PARALICHTHYS OLIVACEUS*

LIU Jing-Ke, CHEN Xiao-Lin⁺, LI Kui-Ran⁺⁺, XU Shi-Hong

(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

⁺(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071; Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100039)

⁺⁺(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao, 266003)

Abstract The $n-6$ highly unsaturated fatty acids ($n-6$ HUFAs), just like $n-3$ ones ($n-3$ HUFAs), are essential to marine larval fish for their growth and survival. However, at present, its importance has not yet been fully emphasized in the study on the nutrition of marine larval fish. Arachidonic acid (AA), a type of $n-6$ HUFAs, was studied based on few available reports to reveal the effects of AA on the growth and survival of larval Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* fed with microdiet.

The feeding experiment was designed in different contents of AA in experimental microdiets and to find out the relation between the content and the growth and survival of the flounder, and their tissue compositions and tolerance against different ambient stresses. Four formulated experimental microdiets were made containing at AA dietary contents of 0.06%, 1.00%, 1.50% or 2.00%, respectively, with same proportions of $n-3$ HUFA and DHA/EPA. Major base of the formula for the four microdiets consisted of special fish meal 74% (dry weight), mixed oils 10%, mixed vitamins 5.4%, mixed minerals 4.5%, phagostimulant 3.0%, and binders 3.1%. Larval fish were divided into four groups. And each group was subdivided in two containers at 200 each. Before experiment start, 40 were randomly picked for measuring the length, yielding mean total length of 4—5mm. The experiment began on May 24th, 2004, and ended on June 18th, 2004, lasted 26 days. The temperature of seawater was 17.5—21.5 °C, pH 8.2—8.3, salinity 33, with continuous aeration. Water in the containers were changed by 1/2—4/5 daily. After the experiment, tests on low oxygen and high salinity were carried out to check the tolerance of larval fish to different stresses. The total length of every fish was measured by hand, and the survival rate of larval fish in every container was counted. Meanwhile, the contents of fatty acids in the fish bodies were measured by gas chromatography. All the data were analyzed statistically.

The results showed that, when AA increasing from 0.06% to 1.5% in the microdiets, the mean total length of the fish increased from (11.83 ± 1.04) mm to (13.58 ± 1.08) mm, and the survival percentages of them were from $(35.75 \pm 2.40)\%$ to $(44.75 \pm 2.49)\%$. However, when AA content increased from 1.5% to 2.0%, the mean total length reduced to (12.50 ± 0.79) mm, and the survival rate to $(32.00 \pm 2.33)\%$. The low-oxygen test and high-salinity test showed that, at 1.5% of AA content in experimental microdiet, the survival rate was the highest (100% and 95%, respectively). The AA contents in the fish bodies increased synchronically with those in the experimental microdiets, shown in our measurement. Therefore, under the experimental conditions, the optimal content of AA in microdiet for larval Japanese flounder was about 1.5%.

Key words Experimental microdiets, Aarachidonic acid (AA), Larval Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*