

微粒饲料中以微藻粉替代鱼油对牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 稚鱼生长存活和 脂肪酸组成的影响*

乔洪金¹ 王际英^{1①} 张利民¹ 孙春晓¹ 李宝山¹
丛超^{1,2} 宋志东¹ 柳旭东¹

(1. 山东省海洋资源与环境研究院 山东省海洋生态修复重点实验室 烟台 264006;
2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 以 18 日龄的牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)稚鱼为研究对象,通过 11 d 的生长实验,研究了添加不同比例的微藻粉替代鱼油对牙鲆稚鱼生长、存活率和脂肪酸组成的影响。以鱼油组(FO)为对照组,以裂壶藻粉(*Schizochytrium* sp.)、微绿球藻粉(*Nannochloropsis* sp.)和橄榄油替代不同比例鱼油,配制成 5 组等氮等能的实验饲料,分别命名为鱼油组(FO)、50%混合替代组(M50)、100%混合替代组(M100)、100%裂壶藻橄榄油替代组(S100)、100%微绿球藻橄榄油替代组(N100)。结果显示,微藻粉替代鱼油对牙鲆稚鱼的生长无显著影响;含有裂壶藻的各饲料组(M50、M100、S100)成活率显著高于 FO 组和 N100 组($P<0.05$);微藻粉替代鱼油不影响牙鲆稚鱼主要脂肪酸的组成;Person 相关性分析发现,C14:0、C16:1n-7、C18:2n-6、C20:0、C18:3n-3、C22:0、C20:4n-3、EPA、C22:5n-6 和 DHA 的百分含量均与其饲料中的百分含量呈显著正相关($P<0.05$);总饱和脂肪酸、总单不饱和脂肪酸、n-3 多不饱和脂肪酸的百分含量以及 DHA/EPA 比率均与其饲料组成表现出显著正相关($P<0.05$)。综上所述,微藻作为脂肪源替代鱼油完全可以满足牙鲆稚鱼的生长和发育,各种脂肪酸均可以被牙鲆稚鱼充分消化和吸收,并且添加两种微藻后提高了稚鱼的 DHA 含量和 DHA/EPA 比率,与鱼油对照组相比显著提高了牙鲆稚鱼的成活率。因此,以微藻替代鱼油在牙鲆稚鱼的培育中是可行的。

关键词 牙鲆稚鱼;微粒饲料;微藻;鱼油;脂肪酸

中图分类号 S965 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)05-0056-08

高不饱和脂肪酸(HUFA)作为海水鱼类饲料中的必需营养素,目前主要来源于鱼油。进入 21 世纪以来,鱼油价格伴随着捕捞量的骤减和养殖业规模的扩大而快速上涨,导致海水鱼饲料的成本随之上升,“以鱼养鱼”的养殖模式已经显现出不可持续的趋势,寻

找鱼油替代原料已成为当务之急。植物油价格低、产量高,是替代鱼油的首选。然而,由于植物油不含 HUFA,完全以植物油替代鱼油往往不利于鱼体的健康(Mourente, 2003)和肌肉品质(López, 2005; Noffs *et al.*, 2009)。因此,水产饲料中必须添加 HUFA 以保证养

* 山东省科技发展计划(2014GHY115006)、海洋生物产业水生动物营养与饲料研发创新示范平台(201601002)、国家海洋公益性行业专项(201205025)、山东省优秀中青年科学家奖励基金(BS2013HZ018)和山东省水生动物营养与饲料泰山学者岗位(HYK201004)共同资助。乔洪金, E-mail: hongjinqiao@hotmail.com

① 通讯作者:王际英,研究员, E-mail: ytwjy@126.com.

收稿日期: 2015-06-01, 收修改稿日期: 2015-07-03

殖产量和营养品质。

从食物链的传递关系来看, 鱼体内的 HUFA 多数来自食物链底层的微藻。目前, 微藻的规模化生产已经使其成本显著下降, 因此, 利用微藻替代鱼油将是解决鱼油危机的理想途径。Harel 等(2002)利用异养微藻对轮虫(*Brachionus plicatilis*)和卤虫(*Artemia salina*)进行营养强化, 在轮虫和卤虫体内检测到了显著提高的 HUFA 含量; 在条纹鲈鱼(*Morone saxatilis*)亲鱼中以微藻粉替代 60% 的鱼油对其生长无显著影响。在大西洋鲑(*Salmo salar*)中以微藻粉替代鱼油, 替代后对鱼的生长和体组成等无显著影响, 但攻毒实验的表现要逊于鱼油组(Carter *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2007)。在金头鲷(*Sparus aurata*)仔稚鱼饲料中添加微藻粉不仅提高了鱼体 DHA 的含量, 而且促进了生长, 提高了成活率(Atalah *et al.*, 2007; Ganuza *et al.*, 2008)。

本研究采用富含 DHA 的裂壶藻(*Schizochytrium* sp.)和富含 EPA 的微绿球藻(*Nannochloropsis* sp.)替代鱼油, 研究对牙鲆稚鱼生长和脂肪酸组成的影响, 以评估在海水鱼微粒子饲料中以微藻粉替代鱼油的可行性。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

以白鱼粉、虾粉为主要蛋白源, 鱼油为脂肪源, 配制粗蛋白含量为 55%、粗脂肪含量为 11% 的基础饲料。在此基础上, 用裂壶藻粉(美国 Alltech 公司)和微绿球藻粉(烟台海融生物技术有限公司)替代基础饲料中的鱼油, 以橄榄油(西班牙 Oleostepa 公司)作为补充以平衡各组的脂肪含量, 配制成 5 组等氮等能的实验饲料, 分别命名为鱼油组(FO), 50% 混合植物油替代组(M50)、100% 混合植物油替代组(M100)、100% 裂壶藻橄榄油替代组(S100)、100% 微绿球藻橄榄油替代组(N100)。饲料配方及营养组成见表 1。各组饲料的脂肪酸组成见表 2。饲料原料粉碎过 80 目筛, 按比例称量混匀后加油脂均匀混合, 然后将明胶溶于 80℃ 水中, 与混合物均匀混合, 立即装入裱花袋中制粒, 制成后于 40℃ 烘 24 h, 将颗粒磨碎后过 80 目筛即得微粒子饲料, 将其保存于 -20℃ 冰箱备用。

1.2 饲养管理和样品采集

养殖实验于 2014 年 4 月在山东蓬莱宗哲水产养殖有限公司育苗车间进行。选取孵化后 18 d 的牙鲆稚鱼, 随机放养于 15 个圆形塑料养殖桶中(直径 50 cm, 高 80 cm, 水深控制在 50 cm 左右), 每桶 200 尾, 每种饲料随机投饲 3 桶。实验水温控制在 18℃ 左右,

溶氧 80% 以上, 光照周期为 12 h:12 h, 在光照周期内每 1 h 向水面均匀抛洒 1 次微粒子饲料(2 g/d), 每日换 1/2 桶水, 投喂结束后, 清理水面残饵并用虹吸法去除底部的残饵粪便。实验共进行 11 d, 在实验开始后, 前 4 d 每天投喂酵母强化的卤虫 1 次(1.5 个/ml)。

实验结束后, 计数存活条数, 计算成活率; 实验前后用带有目微尺的显微镜测量 20 条鱼的体长; 用蒸馏水冲洗 3 次, 于 110℃ 烘干至恒重, 测定体重; 剩余稚鱼用蒸馏水冲洗后保存于 -80℃ 备用。

1.3 脂肪酸分析

将用于测定脂肪酸的样品(稚鱼和饲料)冷冻干燥至恒重, 研磨成粉末, 按照 Qiao 等(2015)的方法进行转酯化。取所得脂肪酸甲酯的正己烷溶液 2 μ l 进行气相色谱(岛津 GC-2010)测定, 所用毛细管柱为 Supelco SP-2560(100 m \times 0.25 mm, 膜厚度 0.20 μ m), 进样口和检测器的温度设定为 260℃, 柱温升温程序为 140℃, 以 4℃/min 的速率升高至 240℃ 并恒温 10 min, 以高纯 N₂ 作为载气, 通过与 37 种脂肪酸混标(美国 Supelco 公司)对照确定脂肪酸组分。

1.4 数据处理与分析

实验数据采用 SPSS 11.0 软件(美国 SPSS 公司)进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 差异显著则进行 Duncan's 多重比较检验, 显著水平设定为 0.05。对鱼体的脂肪酸百分含量与其饲料中的百分含量进行 Person 相关性分析, 显著水平设定为 0.05, 极显著水平设定为 0.01。统计数据均以平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)的形式表示。

2 结果

2.1 微藻粉替代鱼油对牙鲆稚鱼生长和成活率的影响

从表 3 可以看出, 实验前后牙鲆稚鱼的体重和体长均表现出增长。其中, 各饲料组之间平均体重的差异不显著, M50 组的平均体重最大, N100 组的平均体重最小; M50 组的平均体长最大, N100 组的平均体长最小, M50 组的平均体长显著大于 M100 组和 N100 组; M100 组的成活率最高, FO 组的成活率最低, 但与 N100 组差异不显著, M50 组、M100 组、S100 组的成活率显著高于 FO 组和 N100 组, 也即包含裂壶藻的饲料组其成活率显著高于其他组。

2.2 微藻粉替代鱼油对牙鲆稚鱼脂肪酸组成和含量的影响

从表 4 可以看出, 不管投喂何种饲料, 牙鲆稚鱼主

表1 实验饲料的配方和成分
Tab.1 Ingredients and proximate composition of the experimental diets

组分 Ingredients (g/kg)	鱼油组	鱼油藻混合组	藻混合组	裂壶藻组	微绿球藻组
	Fish oil	Mixed fish oil and microalgae	Mixed microalgae	<i>Schizochytrium</i> sp.	<i>Nannochloropsis</i> sp.
	FO	M50	M100	S100	N100
复合蛋白源 Mixed protein source	724.4	675.1	0	0	0
脱脂复合蛋白源 Defatted mixed protein source	0	0	580.7	639.7	606.4
鱼油 Fish oil	28.7	14.4	0	0	0
橄榄油 Olive oil	0	37.4	21.3	37.7	73.3
裂壶藻 <i>Schizochytrium</i> sp.	0	38.5	192.4	192.4	0
微绿球藻 <i>Nannochloropsis</i> sp.	0	64.0	93.9	0	93.9
大豆卵磷脂 Soy lecithin	38.0	37.1	36.1	36.1	36.1
抗氧化剂 Antioxidant	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
诱食剂 Attractant	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
多维 Vitamin mixture	19.2	19.2	19.2	19.2	19.2
多矿 Mineral mixture	19.2	19.2	19.2	19.2	19.2
微晶纤维素 Microcrystalline cellulose	133.4	58.2	0.0	18.6	114.8
明胶 Gelatin	28.7	28.7	28.7	28.7	28.7
主要成分 Proximate composition (%干物质基础, % dry matter basis)					
粗蛋白 Crude protein (%)	54.9	55.3	55	55.5	54.5
粗脂肪 Crude lipid (%)	11.5	11.1	10.7	11.4	10.6
粗灰分 Crude ash (%)	17.2	17.2	18.4	18.5	17.2
总能 Gross energy (kJ/g)	19.8	20.1	19.9	20.4	19.3

复合蛋白源 Mixed protein source: 白鱼粉: 虾粉=9:1 混合而成 White fish meal: shrimp meal=9:1

脱脂复合蛋白源 Defatted mixed protein source: 复合鱼粉索氏抽提去脂肪后获得 Mixed fish meal was defatted by Soxhlet extraction

裂壶藻 *Schizochytrium* sp.: 蛋白含量 Protein content 9.6%, 脂肪含量 Lipid content 27.0%, DHA 占总脂含量 Percentage content of DHA in total lipid 20.1%, 无 EPA Without EPA

微绿球藻 *Nannochloropsis* sp.: 蛋白含量 Protein content 45.2%, 脂肪含量 Lipid content 17.5%, EPA 占总脂含量 Percentage content of EPA in total lipid 5.3%, 无 DHA Without DHA

诱食剂 Attractant: 肌苷-5'-单磷酸 Inosine 5'-monophosphate 2 g/kg; 甜菜碱 Betaine 2 g/kg; 牛磺酸 Taurine 4 g/kg

多维 Vitamin mixtures(mg/100 g diets): 氯化胆碱 Choline chloride(2965.8), 肌醇 Inositol(1450.9), 烟酸 Nicotinic acid (290.16), 维生素 C Ascorbyl polyphosphate (180), 维生素 E α -tocopherol (150), 对氨基苯甲酸 p-aminobenzoic acid(145), 泛酸钙 Calcium panthotenat(101.59), 核黄素 Riboflavin(72.53), 维生素 B1 Thiamin HCl(21.77), 维生素 B6 Piridoxyne HCl (17.28), 维生素 K Menadione(17.28), 维生素 D3 Cholecalciferol(3.65), 维生素 A Retinol acetate(0.18), 维生素 B12 Cyanocobalamin(0.03)

多矿 Mineral mixture (mg/kg diet): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 3568.0; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 25568.0; KCl, 3020.5; $KAl(SO_4)_2$, 8.3; $CoCl_2$, 28.0; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 353.0; Ca-lactate, 15968.0; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 9.0; KI, 7.0; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 63.1; Na_2SeO_3 , 1.5; $C_6H_5O_7Fe \cdot 5H_2O$, 1533.0; NaCl, 100.0; NaF, 4.0

要的几种脂肪酸分别为 C16:0(15.61%–19.78%)、C18:0 (8.14%–9.52%)、C18:1n-9(10.84%–17.06%)、C18:1n-7 (4.33%–5.70%)、C18:2n-6(3.49–7.10%)、ARA(2.69%–4.36%)、EPA(2.73%–7.42%)和 DHA(11.15%–23.29%)。与实验前投喂卤虫的稚鱼相比, 投喂微粒子饲料降低了 C16:1n-7、C18:3n-6、C18:3n-3、C20:3n-3、C20:4n-3 和 C22:5n-3 等几种非主要脂肪酸的百分比, 但投喂卤虫

的稚鱼主要脂肪酸的组成均在各微粒子饲料组的变化范围内。

各组饲料投喂的稚鱼总饱和脂肪酸(SFA)百分含量无显著性差异, 其中, M100 组和 S100 组的 C14:0 和 C16:0 百分含量均显著高于其他各组, 与其在饲料中的高含量一致; M100 组和 S100 组的 MUFA 含量显著低于其他各组, 也与其在饲料中的低含量一致;

表 2 实验饲料的脂肪酸组成
Tab.2 Fatty acid compositions of the experimental diets

脂肪酸 Fatty acid	饲料组 Diets				
	FO	M50	M100	S100	N100
C14:0	1.76	2.24	4.64	4.28	0.85
C16:0	15.91	18.13	23.18	22.43	16.81
C16:1n-7	4.62	4.52	2.24	0.64	3.59
C18:0	3.31	2.64	1.53	1.65	2.69
C18:1n-9	10.20	22.74	8.25	13.16	44.03
C18:1n-7	4.65	3.71	1.20	1.44	3.03
C18:2n-6	14.47	12.14	8.65	9.28	17.76
C20:0	0.15	0.20	0.15	0.17	0.26
C18:3n-6	1.04	0.65	0.15	0.17	0.39
C18:3n-3	1.46	0.90	0.17	0.97	1.62
C20:3n-6	0.87	0.54	0.28	0.27	0
C22:0	0.15	0.13	0.11	0.14	0.17
C22:1n-11	0	0.16	0.31	0.26	0.07
C20:3n-3	1.53	0.19	0.76	0.74	0
ARA	0.78	0.86	0.96	0.56	0.80
C20:4n-3	0.43	0.32	0.56	0.55	0
C24:0	0	0	0.19	0.19	0.11
EPA	12.78	8.46	4.45	2.22	4.59
C22:5n-6	0.48	2.37	10.90	10.81	0.21
C22:5n-3	1.88	0.88	0.45	0.43	0
DHA	18.49	14.23	28.75	28.64	2.25
其他 Others	5.07	3.99	2.13	0.99	0.77
SAT	21.27	23.34	29.80	28.86	20.89
MUFA	19.46	31.14	12.00	15.50	50.72
PUFA(n-3)	36.56	24.97	35.14	33.55	8.46
HUFA(n-3)	33.15	23.57	33.65	31.29	6.84
n-3/n-6	2.07	1.51	1.68	1.59	0.44
DHA/EPA	1.45	1.68	6.46	12.93	0.49

表 3 牙鲆稚鱼实验前后的全长、体重和成活率
Tab.3 Initial and final total length, body weight and survival rate of Japanese flounder juveniles

项目 Items	实验前	实验后 After experiment				
	Before experiment	FO	M50	M100	S100	N100
体重 Body weight (mg)	0.73±0.10	1.99±0.41	2.07±0.51	1.94±0.31	1.84±0.19	1.51±0.21
体长 Body length (mm)	8.53±0.46	9.86±0.33 ^{ab}	10.13±0.49 ^a	9.52±0.11 ^b	9.59±0.34 ^a	9.50±0.10 ^b
成活率 Survival rate (%)		51.33±10.35 ^a	72.44±10.78 ^b	82.44±6.84 ^b	68.44±6.34 ^b	53.11±4.44 ^a

注: 数据均为平均值±标准差($n=20$); 同一列中不同字母标记的值表示差异显著($P<0.05$)

Note: Values (Mean±SD of 20 replicates) within the same row labeled with different letters were significantly different ($P<0.05$)

M100组和S100组的PUFA(n-3)含量显著高于其他各组,其中,DHA含量也显著高于其他各组,与其饲料组成一致。HUFA(n-3)含量在藻粉替代后出现显著下降,其中,M100组和S100组显著高于M50和N100组。n-3/n-6随着藻粉替代量的增加呈现出逐渐下降的趋势,但与其饲料组成的变化不一致;鱼体DHA/EPA随着藻粉替代量的增加呈现先上升后下降的趋势,与

其饲料组成的变化一致。

通过Pearson相关性分析发现,C14:0、C16:1n-7、C18:2n-6、C20:0、C18:3n-3、C22:0、C20:4n-3、EPA、C22:5n-6和DHA的百分含量均与其饲料中的百分含量呈显著正相关($P<0.05$),其中,C14:0、C16:1n-7、C22:5n-6和DHA表现出极显著正相关($P<0.01$);C20:4n-3的百分含量与其饲料中的百分含量呈现出

表4 牙鲆稚鱼实验前后的脂肪酸组成分析及与饲料脂肪酸组成的 Pearson 相关分析

Tab.4 Initial and final fatty acid composition of Japanese flounder juveniles and Pearson correlation analysis of fatty acid composition in diets (%)

脂肪酸 Fatty acid	实验前 Before experiment	实验后 After experiment					<i>r</i>
		FO [#]	M50 [#]	M100 [#]	S100 [#]	N100 [#]	
C14:0	1.44	1.04±0.09 ^{ab}	1.05±0.27 ^{ab}	1.44±0.24 ^c	1.33±0.06 ^{ac}	0.74±0.04 ^b	0.978 ^{**}
C16:0	15.61	17.14±0.25 ^{ac}	17.5±0.43 ^a	19.78±1.23 ^b	18.78±0.31 ^b	16.56±0.36 ^c	0.228
C16:1n-7	4.55	2.95±0.16 ^a	2.90±0.26 ^a	1.96±0.09 ^b	1.41±0.09 ^c	2.53±0.13 ^d	0.999 ^{**}
C18:0	8.17	8.64±0.22 ^a	7.73±0.5 ^b	8.36±0.17 ^a	8.14±0.11 ^{ab}	9.52±0.17 ^c	-0.399
C18:1n-9	14.99	12.82±0.14 ^a	16.88±1.03 ^b	10.84±0.43 ^c	12.17±0.14 ^a	17.06±1.12 ^b	0.852
C18:1n-7	4.73	5.13±0.29 ^{ab}	4.33±0.80 ^a	5.00±0.26 ^{ab}	4.89±0.39 ^{ab}	5.70±0.49 ^b	-0.020
C18:2n-6	3.49	6.35±0.54 ^a	6.56±0.49 ^a	4.57±0.18 ^b	4.64±0.13 ^b	7.10±0.54 ^a	0.919 [*]
C20:0	0.11	0.20±0.06 ^a	0.22±0.02 ^{ab}	0.21±0.04 ^a	0.22±0.00 ^{ab}	0.28±0.03 ^b	0.955 [*]
C18:3n-6	1.12	0.79±0.08 ^a	0.83±0.07 ^a	0.36±0.03 ^b	0.43±0.05 ^b	0.66±0.03 ^c	0.865
C18:3n-3	3.5	1.61±0.16 ^a	1.33±0.03 ^b	1.03±0.04 ^c	1.09±0.11 ^c	1.88±0.13 ^d	0.884 [*]
C20:3n-6	0.27	0.47±0.07	0.4±0.07	0.44±0.03	0.41±0.05	0.49±0.05	-0.149
C22:0	0.49	0.26±0.02 ^{ab}	0.23±0.02 ^{ab}	0.22±0.02 ^a	0.23±0.03 ^{ab}	0.26±0.00 ^b	0.896 [*]
C22:1n-11	0.77	0.41±0.08 ^{ab}	0.36±0.06 ^a	0.47±0.03 ^b	0.47±0.03 ^b	0.59±0.03 ^d	-0.027
C20:3n-3	1.8	1.53±0.38	1.23±0.21	1.23±0.20	1.34±0.09	1.52±0.15	0.252
ARA	3.38	3.20±0.23 ^a	2.69±0.29 ^b	3.17±0.28 ^{ab}	3.09±0.18 ^{ab}	4.36±0.26 ^d	-0.013
C20:4n-3	2.28	0.71±0.09 ^a	0.64±0.02 ^{ab}	0.64±0.02 ^{ab}	0.62±0.02 ^b	0.91±0.05 ^c	-0.905 [*]
C24:0	0.28	0.30±0.06 ^{ac}	0.70±0.05 ^b	0.25±0.04 ^c	0.24±0.03 ^c	0.34±0.04 ^a	-0.671
EPA	6.28	7.42±0.51 ^a	6.30±0.19 ^b	3.58±0.36 ^c	2.73±0.13 ^d	5.75±0.15 ^b	0.892 [*]
C22:5n-6	2.33	1.98±0.13 ^a	3.46±0.14 ^b	8.13±0.42 ^c	8.61±0.31 ^c	2.45±0.32 ^a	0.996 ^{**}
C22:5n-3	3.29	2.84±0.08 ^a	2.07±0.06 ^b	1.49±0.18 ^c	1.39±0.11 ^c	2.95±0.16 ^a	0.292
DHA	11.15	19.16±0.41 ^a	17.29±0.46 ^b	22.77±1.20 ^c	23.29±0.67 ^c	12.80±0.56 ^d	0.999 ^{**}
其他 Others	9.98	5.05±0.82	4.84±2.56	4.06±0.21	4.48±0.93	5.54±0.24	-
SFA	26.1	27.59±0.10	27.89±0.71	30.28±1.74	28.94±0.37	27.70±0.35	0.930 [*]
MUFA	25.04	21.31±0.36 ^a	24.47±1.88 ^b	18.27±0.70 ^c	18.95±0.38 ^c	25.88±1.12 ^b	0.940 [*]
PUFA(n-3)	28.31	33.26±0.38 ^a	28.85±0.20 ^b	30.73±1.51 ^c	30.45±0.53 ^c	25.81±0.89 ^d	0.942 [*]
HUFA(n-3)	20.72	29.41±0.67 ^a	25.66±0.4 ^c	27.83±1.64 ^{ab}	27.41±0.62 ^b	21.49±0.87 ^d	0.976 [*]
n-3/n-6	2.68	2.60±0.07 ^a	2.07±0.04 ^b	1.84±0.03 ^c	1.77±0.01 ^{cd}	1.71±0.06 ^d	0.679
DHA/EPA	1.78	2.59±0.18 ^a	2.75±0.14 ^a	6.39±0.45 ^b	8.55±0.53 ^c	2.23±0.04 ^d	0.983 ^{**}

[#]数据均为平均值±标准差($n=3$)；同一列中不同字母标记的值表示差异显著；*表示相关性显著($P<0.05$)，**表示相关性极显著($P<0.01$)

[#]Values (Mean±SD of three replicates) within the same row labeled with different letters were significantly different; * represents significant difference ($P<0.05$); ** represents highly significant difference ($P<0.01$)

显著负相关($P<0.05$)。从汇总指标来看, SFA、MUFA、PUFA(n-3)和 HUFA(n-3)百分含量以及 DHA/EPA 均与其饲料组成表现出显著正相关($P<0.05$), 并且 DHA/EPA 表现出极显著正相关($P<0.01$)。

3 讨论

3.1 微藻粉替代鱼油对牙鲆稚鱼生长和发育的影响

牙鲆仔稚鱼的必需脂肪酸主要为 EPA 和 DHA (n-3 HUFA), 二者对其生长、成活率、耐盐性和脑的

发育具有显著影响(Furuita *et al*, 1998、1999)。Izquierdo 等(1992)研究表明, 饵料卤虫中 n-3 HUFA 升高到 3.5% 时, 显著增加了牙鲆仔稚鱼的生长, 但进一步提高 n-3 HUFA 的水平不能继续促进生长。本研究中 n-3 HUFA 水平在 2.6%(M50 组)以上时, 生长也未出现显著差异, 在 0.7%(N100 组)时体重增加减小, 但无显著差异, 与上述研究结果相似。

与对照组(FO)相比, 添加微藻粉替代鱼油没有显著影响到牙鲆稚鱼的生长和成活率(表3), 这与其他研究结果一致(Atalah *et al*, 2007; Ganuza *et al*, 2008;

Eryalçın *et al.*, 2013), 并且鱼体内各种脂肪酸的含量也与饲料中的含量有对应关系(表 4), 表明微藻粉完全可以被牙鲆稚鱼消化利用。添加裂壶藻的各组(M50 组, M100 组和 S100 组)成活率显著高于其他组, 可能与其 DHA/EPA 比率较高有关(表 2), DHA/EPA 比率的提高有助于海水鱼稚鱼的生长和存活(Rodríguez *et al.*, 1994; 1997; Reitan *et al.*, 1994; Copeman *et al.*, 2002)。

N100 组在体长和体重上均低于其他各组, 成活率低于添加裂壶藻的各组, 表明 DHA 的缺乏影响了牙鲆稚鱼的生长和存活, 这与 DHA 在稚鱼发育中的重要作用有关。许多研究均表明, DHA 的缺乏会导致海水鱼稚鱼生长减缓, 成活率降低, 体色素乱(刘镜恪, 2002; Izquierdo *et al.*, 2000; Reitan *et al.*, 1994; Watanabe, 1993)。在稚鱼发育过程中, DHA 往往被选择性地保留在极性脂(磷脂)中。因此, 在磷脂构成的生物膜中, DHA 发挥着调节膜流动性的作用, DHA 大量被储存在嗅觉神经、视网膜和中枢神经系统中, 提高了捕食的灵敏性和能量收支(Izquierdo *et al.*, 1996)。

3.2 鱼体脂肪酸组成与饲料组成的关系

脂肪酸在鱼体内的沉积一般受到饲料脂肪酸含量的影响(Bell *et al.*, 1994; Sargent *et al.*, 1995), 饲料脂肪酸的组成往往和鱼体内的脂肪酸组成具有一致性(Gatlin *et al.*, 1982; Lee, 2001)。本研究中牙鲆稚鱼脂肪酸的组成和含量随着饲料中脂肪酸组成和含量而变化, 其中多种脂肪酸呈现出显著的正相关。在 SFA 中, C14:0 和 C20:0 均表现出显著正相关, 而 C16:0, C18:0 和 C24:0 却没有显著相关性, 这可能与鱼类以 C16:0, C18:0 为主要饱和脂肪酸有关, 这两种饱和脂肪酸均可以在鱼类体内从头合成, 而且还大量被分解供能, 因此, 并没有随着饲料含量的改变而改变(Sargent *et al.*, 1989; Tocher, 2010)。在 MUFA 中, 仅 C16:1n-7 表现出正相关, 鱼类具有合成各种 MUFA 的能力, 但是仅大量分解利用其中的 C18:1n-9、C20:1n-9 和 C22:1n-11(Henderson *et al.*, 1984、1989)。因此, 饲料中较高含量的 C16:1n-7 得以在鱼体内沉积, 但是对 C18:1n-7 目前尚未明确合成和代谢的结论。由于脊椎动物包括鱼类一般都缺乏 $\Delta 12$ 和 $\Delta 15$ 去饱和酶, 不能从 C18:1n-9 合成 C18:2n-6 和 C18:3n-3 (Tocher *et al.*, 2010), 鱼体内的这两种脂肪酸几乎全部来源于饲料, 因此, 表现出显著正相关。各饲料组中 C18:2n-6 的含量都很高, 这导致了 C18:2n-6 在鱼体内的含量普遍高于实验前鱼体内的含量, 并且其鱼体内的沉积与饲料中的含量呈现出明显的正相关, 可能与饲料中的 C18:2n-6 在鱼体内被直接地吸收和酯化有关(Henderson,

1996), 这与对杂交条纹鲈(*Morone saxatilis*) (Nematipour *et al.*, 1993)和虹鳟(*Salmo gairdnerii*) (Henderson *et al.*, 1981)的研究结果相似。

牙鲆稚鱼体内的 DHA 和 EPA 含量随着饲料中 DHA 和 EPA 含量的增加而增加, 特别是 DHA 的含量表现出极显著的正相关性($P < 0.01$), 表明这两种主要的高不饱和脂肪酸几乎全部来自于饲料, 也导致了鱼体 DHA/EPA 与饲料组成呈现出极显著正相关($P < 0.01$), 这与牙鲆仔稚鱼不能自身合成 DHA 和 EPA 有关(刘镜恪, 2002), 并且进一步说明, 微藻中的 DHA 和 EPA 可以被牙鲆稚鱼有效地消化和吸收, 增加组织中 DHA 和 EPA 的含量。饲料中低的 DHA 含量倾向于促进 DHA 在鱼体内的沉积, 在鱼类组织中 EPA 的消耗也有利于 DHA 的沉积(Bell *et al.*, 1985), 在牙鲆稚鱼体内 DHA/EPA 的比值均大于 1, 即使 N100 组饲料的 DHA/EPA 比值为 0.49, 其对应鱼体 DHA/EPA 也达到 2.23, 表明了牙鲆稚鱼具有选择性保留 DHA 的机制, 而且对 DHA 的需求量可能要高于 EPA。

DHA/EPA 比率与成活率之间也存在着正相关, 饲料中较高的 DHA/EPA 提高了牙鲆稚鱼的成活率, 然而, S100 组最高的 DHA/EPA 却未导致最高的成活率(表 1, 表 4)。这与 DHA 和 EPA 在仔稚鱼发育过程中的不同作用有关, 许多研究表明, DHA 可能发挥着更为关键的作用(Takeuchi *et al.*, 1990; Watanabe, 1993; Hirofumi *et al.*, 1999; 常青等, 2009)。

牙鲆稚鱼体内 C22:5n-3 的含量与饲料中 C22:5n-3 没有相关性, 并且 N100 组饲料中检测不到 C22:5n-3, 而稚鱼体内却出现了最高含量的 C22:5n-3, 这表明牙鲆稚鱼具有将 EPA(C20:5n-3)加长为 C22:5n-3 的能力, 这与 Hirofumi 等(1999)的研究结果一致。在饲料 DHA 供给不足的条件(N100 组), 有大量的 DHA 在鱼体内积累, 饲料中 DHA/EPA 比率为 0.49, 也翻转为稚鱼体内的 2.23, 这暗示 DHA 可能来源于 EPA, 但牙鲆转化 EPA 为 DHA 的能力较低(Hirofumi *et al.*, 1999)。因此, DHA 选择性保留可能在其中发挥了更主要的作用, 尚需进一步研究二者在其中所起的作用。

3.3 替代可行性

本研究表明, 微藻作为脂肪源替代鱼油完全可以满足牙鲆稚鱼的生长和发育, 其中起重要作用的 DHA 和 EPA 等高不饱和脂肪酸均可以被牙鲆稚鱼充分消化和吸收, 并且添加两种微藻后提高了 DHA 的含量和 DHA/EPA 比率, 与鱼油对照组相比显著提高了牙鲆稚鱼的成活率。因此, 以微藻替代鱼油在牙鲆稚鱼的培育中是可行的, 这与 Atalah 等(2007)和

Ganuza 等(2008)的研究结果一致。这些研究和本研究的结论是一致的,海水鱼仔稚鱼具有完整的消化和吸收微藻脂肪酸的酶系,微藻中的高不饱和脂肪酸可以满足仔稚鱼的生长和发育,用微藻替代鱼油将是解决“以鱼养鱼”的技术瓶颈的重要途径。

参 考 文 献

- 常青, 梁萌青, 张汉华, 等. 海水仔稚鱼的营养需求与微颗粒饲料研究进展. 渔业科学进展, 2009, 30(1): 130-136
- 刘镜恪. 海鱼早期阶段必需脂肪酸和磷脂的研究现状与展望. 海洋水产研究, 2002, 23(2): 58-64
- Atalah E, Cruz CMH, Izquierdo MS, *et al.* Two microalgae *Cryptocodinium cohnii* and *Phaeodactylum tricoratum* as alternative source of essential fatty acids in starter feeds for seabream (*Sparus aurata*). Aquaculture, 2007, 270(1-4): 178-185
- Bell JG, Tocher DR, MacDonald FM, *et al.* Effects of diets rich in linoleic (18:2n-6) and α -linolenic (18:3n-3) acids on the growth, lipid class and fatty acid compositions and eicosanoid production in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Fish Physiol Biochem, 1994, 13(2): 105-118
- Bell MV, Henderson RJ, Sargent JR. Changes in the fatty acid composition of phospholipids from turbot (*Scophthalmus maximus*) in relation to dietary polyunsaturated fatty acid deficiencies. Comp Biochem Phys B, Comp Biochem, 1985, 81(1): 193-198
- Copeman LA, Parrish CC, Brown JA, *et al.* Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment. Aquaculture, 2002, 210(1-4): 285-304
- Eryalçın KM, Roo J, Saleh R, *et al.* Fish oil replacement by different microalgal products in microdiets for early weaning of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Aquacult Res, 2013, 44(5): 819-828
- Ganuza E, Benítez-Santana T, Atalah E, *et al.* *Cryptocodinium cohnii* and *Schizochytrium* sp. as potential substitutes to fisheries-derived oils from seabream (*Sparus aurata*) microdiets. Aquaculture, 2008, 277(1-2): 109-116
- Gatlin DMIII, Stickney RR. Fall-winter growth of young channel catfish in response to quantity and source of dietary lipid. Trans Am Fish Soc, 1982, 111(1): 90-93
- Harel M, Koven W, Lein I, *et al.* Advanced DHA, EPA and ArA enrichment materials for marine aquaculture using single cell heterotrophs. Aquaculture, 2002, 213(1-4): 347-362
- Henderson RJ. Fatty acid metabolism in freshwater fish with particular reference to polyunsaturated fatty acids. Aich Anim Nutr, 1996, 49(1): 5-22
- Henderson RJ, Almatar SM. Seasonal changes in the lipid composition of herring (*Clupea harengus*) in relation to gonad maturation. J Mar Biol Ass UK, 1989, 69(2): 323-334
- Henderson RJ, Sargent JR. Lipid biosynthesis in rainbow trout, *Salmo gairdnerii*, fed diets of differing lipid content. Comp Biochem Phys C, Toxicol Pharmacol, 1981, 69(1): 31-38
- Henderson RJ, Sargent JR, Pirie BJS. Fatty acid catabolism in the capelin *Mallotus villosus* (Muller) during sexual maturation. Mar Biol Letters, 1984, 5: 115-126
- Furuita H, Takeuchi T, Uematsu K. Effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on growth, survival and brain development of larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture, 1998, 161(1): 269-279
- Furuita H, Kooichi K, Takeuchi T. Effect of different levels of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in Artemia nauplii on growth, survival and salinity tolerance of larvae of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture, 1999, 170(1): 59-69
- Izquierdo MS, Arakawa T, Takeuchi T, *et al.* Effect of n-3 HUFA levels in Artemia on growth of larval Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture, 1992, 105(1): 73-82
- Izquierdo MS. Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. Aquacult Nutr, 1996, 2(4): 183-191
- Izquierdo MS, Socorro J, Arantzamendi L, *et al.* Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. Fish Physiol Biochem, 2000, 22(2): 97-107
- Lee SM. Review of the lipid and essential fatty acid requirements of rockfish (*Sebastes schlegelii*). Aquacult Res, 2002, 32(s1): 8-17
- López MI. Essential fatty acid requirements in Mediterranean fish species. Cah Options Mediterr, 2005, 63: 91-102
- Mourente G. Accumulation of DHA (docosahexaenoic acid; 22:6n-3) in larval and juvenile fish brain. In: Browman HI, Skiftesvik AB, eds. The big fish bang. Bergen: Proceedings of the 26th annual larval fish conference, 2003, 139-148
- Nematipour GR, Gatlin DMIII. Effects of different kinds of dietary lipid on growth and fatty acid composition of juvenile sunshine bass, *Morone chrysops* ♀ × *M. saxatilis* ♂. Aquaculture, 1993, 114(1-2): 141-154
- Noffs MD, Martino RC, Trugo LC, *et al.* Dietary fish oil replacement with lard and soybean oil affects triacylglycerol and phospholipid muscle and liver docosahexaenoic acid content but not in the brain and eyes of surubim juveniles *Pseudoplatystoma* sp. Fish Physiol Biochem, 2009, 35(3): 399-412
- Reitan KI, Rainuzzo JR, Olsen Y. Influence of lipid composition of live feed on growth, survival and pigmentation of turbot larvae. Aquacult Int, 1994, 2(1): 33-48
- Rodriguez C, Perez JA, Diaz M, *et al.* Influence of the EPA/DHA ratio in rotifers on gilthead seabream (*Sparus aurata*) larval development. Aquaculture, 1997, 150(1-2): 77-89
- Rodriguez C, Perez JA, Izquierdo MS, *et al.* Essential fatty acid requirements of larval gilthead sea bream, *Sparus aurata*

- (L.). *Aquacult Res*, 1994, 25(3): 295–304
- Sargent JR, Bell JG, Bell MV, *et al.* Requirement criteria for essential fatty acids. *J Appl Ichthyol*, 1995, 11(3–4): 183–198
- Sargent JR. Ether-linked glycerides in marine animals. In: Ackman RG, ed. *Marine biogenic lipids, fats and oils*. Bacon Raton: CRC Press, 1989, 175–198
- Takeuchi T, Toyota M, Satoh S, *et al.* Requirement of juvenile red seabream *Pagrus major* for eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1990, 56(8): 1263–1269
- Tocher DR. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Rev Fish Sci*, 2010, 11(2): 107–184
- Watanabe T. Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. *J World Aquacult Soc*, 1993, 24(2): 152–161

(编辑 陈严)

Effects of Dietary Fish Oil Replacement by Microalgae in Microdiets on Growth Performance, Survival and Fatty Acid Profile of Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) Juveniles

QIAO Hongjin¹, WANG Jiyong¹①, ZHANG Limin¹, SUN Chunxiao, LI Baoshan¹,
CONG Chao^{1,2}, SONG Zhidong¹, LIU Xudong¹

(1. Shandong Provincial Key Laboratory of Restoration for Marine Ecology, Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264000; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract The aim of this study was to determine if algal products rich in DHA or EPA are able to completely replace fish oil in microdiets for marine fish juveniles, Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. To address the problem, an 11-d feeding experiment was carried out on 18-day old juveniles. The experimental subjects were fed with five groups of isolipidic and isoenergetic microdiets that were control group with fish oil (FO), 50% replacement group by mixed *Schizochytrium* sp., *Nannochloropsis* sp. and olive oil (M50), 100% replacement group (M100), 100% replacement group by *Schizochytrium* sp. and olive oil (S100), and 100% replacement group by *Nannochloropsis* sp. and olive oil (N100). The results showed that there were no significant effects of fish oil replacement with microalgae on growth. The groups containing *Schizochytrium* sp. (M50, M100 and S100) had higher survival rates than FO and N100 groups. No changes in the major fatty acid compositions of juveniles were observed with the replacement of fish oil by microalgae. In addition, Pearson correlation analysis showed that the percentage content of C14:0, C16:1n-7, C18:2n-6, C20:0, C18:3n-3, C22:0, C20:4n-3, EPA, C22:5n-6 and DHA in juveniles were significantly and positively correlative to those in diets ($P < 0.05$). The same correlations were also observed for total saturated, monounsaturated and n-3 polyunsaturated fatty acids, and DHA/EPA ratio. In conclusion, fish oil replacement with microalgae as lipid sources can fully satisfy the growth and development in juvenile flounder, and fatty acids in microalgae can be effectively digested and absorbed. Furthermore, the addition of microalgae in diets enhanced the DHA content and DHA/EPA ratio in juveniles, and hence improved the survival. Therefore, the fish oil replacement with microalgae in the culture of Japanese flounder juveniles is feasible. This study will be helpful and suggestive for screening new lipid sources to replace strained fish oil resource.

Key words Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) juveniles; Microdiets; Microalgae; Fish oil; Fatty acids

① Corresponding author: WANG Jiyong, E-mail: ytwjy@126.com