

## 摘要

通过探测轮虫对两种微藻的摄食情况,研究轮虫对微藻的摄食量,确定轮虫在生长繁殖的过程中每天摄食单细胞藻的量,并比较了两种细胞大小相差悬殊的微藻对轮虫的投喂效果。设置不同培养条件(自然、黑暗),利用不同的微藻(小球藻、转金属硫蛋白基因聚球藻)作壶状臂尾轮虫(*Brachionus urceus*)的饵料,每 24h 计数轮虫密度,并用分光光度计测微藻的 OD 值。结果表明轮虫自然条件下每天摄食小球藻和聚球藻的细胞数分别为 3.4-6.3 万、4.7-6.9 万,黑暗条件下则分别为 9.2-14 万、11.7-12.8 万。研究不同浓度的小球藻对轮虫的摄食量的影响,发现摄食量与饵料的密度密切相关,密度不同,摄食量不同;壶状臂尾轮虫对不同微藻饵料的摄食速率不同。小球藻的饵料效果优于转金属硫蛋白基因聚球藻。

本文探索轮虫对不同微藻的摄食情况,并比较不同形态的微藻对轮虫的投喂效果,为混合饵料的开发提供依据。设置不同培养条件(自然光照、黑暗),采用各种微藻(小球藻、转金属硫蛋白基因聚球藻、衣藻、水华鱼腥藻)作壶状臂尾轮虫(*Brachionus urceus*)的饵料,每天在解剖镜下计数轮虫密度,并用分光光度计测微藻的 OD 值,通过标准曲线计算出干重。实验表明,轮虫摄食聚球藻的量最大,摄食小球藻的量最少。而且微藻的浓度不同,轮虫所摄食的量也不同。不同种类的饵料,浓度越大,轮虫的摄食量越大。小球藻的饵料效果优于其它三种微藻,对轮虫种群密度效果差异极显著( $P < 0.01$ )。实验发现黑暗条件下,投喂衣藻的轮虫增殖效果最好。

本文研究温度、pH 值及接种时的携卵率对轮虫高效培养的影响,探究壶状臂尾轮虫的适宜培养条件。结果表明,28~29℃为轮虫生长的最适温度;轮虫生长的最适 pH 为 7.5,对 pH 的耐受范围是 4.5-11.5;接种携卵率高的轮虫其增殖倍率也相对较高。

将鱼腥藻,衣藻,聚球藻按不同比例混合后投喂轮虫,比较轮虫的种群密度增殖情况。混合饵料的投喂效果明显优于单一饵料,采用混合饵料投喂的轮虫的密度增殖最快,缩短了达到最大密度的时间,增加了轮虫的繁殖速率。其中鱼腥藻:衣藻:聚球藻为 5:1:1 投喂效果最佳,接种密度为 25ind/mL,4d 后,轮虫最大密度可以达到 940ind/mL。并且投喂的混合饵料中,鱼腥藻的比例越大,轮虫体内蛋白含量越高,最高含量达 65.38%。对(组 8,组 1,组 6)进行气相色谱分析,EPA 在组 8(鱼腥藻:衣藻:聚球藻 5:

1: 1) 中的含量最高, 其它依次是组 6 (鱼腥藻: 衣藻: 聚球藻 1: 3: 1)、组 1 (鱼腥藻: 衣藻: 聚球藻 1: 1: 1)。而 DHA 的含量在组 1 中远高于其他两组。

关键词: 轮虫; 微藻; 摄食量; 营养成分

## Abstract

The research aimed to compare the effects of the different microalgae cells as the feed of Rotifers(*Brachionus urceus*). Rotifer was feed by differnt algae(*Chlorella vulgaris*, transgenic metallothionein *Synechococcus sp.* ) under two kinds of conditions (natural light, dark), and the density of rotifers was counted every day. Results showed that a rotifer could eat up the amount about 34000-63000(*C.v*), 47500-69600(*S.s*) under the natural light, and about 92000-140000(*C.v*), 117000-128000(*S.s*) under dark condition. The rotifers daily feed consumption were tightly related to the microalgae density, the different densities resulted different consumption, and *Chlorella* was better than metallothionein *Synechococcus sp.* for feeding rotifer.

Effects of the difference microalgae cells as feed on growth of Rotifers(*Brachionus urceus*) were compared. The quantity of algae eaten by rotifer and the change of the density of microalgae were calculated. Rotifers were feed by the different algae(*Chlorella vulgaris* ,transgenic metallothionein *Synechococcus sp.*, *Chlamydomonas sp.* and *Anabaena flos-aquae* ), which was cultivated under two kinds of conditions (natural light, dark), the density of rotifers was counted every day. The results showed, rotifers could eat the different dry weight of algae in the same period, and the higher the concentration of the algae, the more they were consumed, The rotifers could grew better in *C. vulgaris* under illumination. The population density of rotifer was significantly ( $P<0.01$ ) different. The results showed the growth of rotifers were best with *Chlamydomonas sp.* under dark condition.

The effects of temperature, pH and amout of rotifer carrying eggs in high density cultures of rotifer were studied. The results showed the rotifer grew fastest at 28-29 °C, and pH 7.5, and they could tolerate in the range of pH4.5-11.5. More eggs bringed by the rotifer, resulted fast increase of the rotifer density.

Rotifers were cultivated by feeding of mixtures(dry weight) of (*Chlamydomonas sp*(*C.s*), *Anabaena flos-aquae*(*A.f*), *Synechococcus sp.* (*S.s*)) to compare the growth of rotifers. The result showed the mixed algae were better to improve the density of rotifers, to shorten time of reaching the maximum density than single algae, and to increase of rotifers reproduction rate. Group 8(*C.s: A.f: S.s: =5:1:1*) was the best for the growth of the rotifers among the experimental groups, which were 940ind/mL. The study also indicated the greater the proportion of *A.f*, the higher content of protein, the maximum content was 65.38% of Group 8. The appraisal results of the fatty acid showed that EPA of Group 8 was higher than Group6 (*C.s: A.f: S.s: =1:3:1*)and Group1. (*C.s: A.f: S.s: =1:1:1*). DHA of Group1 was the highest of the three groups.

Key word: Rotifers; Algae; Food consumption; Nutrient

# 鲁东大学学位论文原创性声明和使用授权说明

## 学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的论文是本人在导师的指导下独立进行研究所取得的研究成果。除了文中特别加以标注引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写的成果作品。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

作者签名：刘文明 日期：09年6月11日

## 学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权鲁东大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

本学位论文属于  保密，在 \_\_\_\_\_ 年解密后适用本授权书。  
 不保密。

(请在以上相应方框内打“√”)

作者签名：刘文明 日期：09年6月11日  
导师签名：郑宇 日期：09年6月11日

## 引言

轮虫是最小的多细胞动物,早在1703年列文虎克首先对它进行了研究,但当时把它归属于原生动物<sup>[1]</sup>。林奈于1758年描述了3种轮虫,可惜并未进行系统的分类。居维叶(Cuvier,1798)把轮虫称作为浸液虫纲(Infusoires)隶属于植形动物界(Zoophytes)并首次把这类动物命名为轮虫(Rotifera)。爱伦堡(Ehrenberg)对轮虫进行了深入的观察和详尽的研究,于1832年创用Rotatoria一词。可见根据命名法优先法原则, Rotifera一词应为轮虫的正名<sup>[2]</sup>。目前人们都习惯有Rotifer来称呼轮虫。由于轮虫形态特殊,使它在动物界的位置和与其他无脊椎动物的关系方面一直存在争论,过去轮虫一般属于线形动物门(Nemathelminthes)中的一个纲,但近代不少动物系统分类学家仔细分析了轮虫的胚胎发生全过程和超微结构后认为把轮虫独立提升为一门=轮虫门,更为合适<sup>[3]</sup>。目前全世界已被描述的轮虫种类达2000种以上,我国已报道的轮虫亦已超过400种,在已报道的轮虫中95%为淡水种类,其中75%的种类营附着生活且大多分布于沿岸带,真正营浮游生活的种类仅有100种左右<sup>[4]</sup>。

壶状臂尾轮虫(以下简称轮虫)属于轮虫门,是一种滤食性、体形50-200  $\mu\text{m}$ 的多细胞动物,生活在淡水中,是江河、湖泊、池塘浮游动物的重要组成部分<sup>[5]</sup>。

我国自二十世纪五十年代后期开始,先后开展了轮虫、卤虫幼体和成体、双壳类软体动物的卵和幼体、桡足类、糖虾等动物性活体饵料的培养和生产。其中轮虫在适口性好,生长繁殖快,并能保持良好育苗水质等方面具有优越性,尤其在淡水水体生态系统结构功能、能量传递及物质转换上具有重要意义。它能摄食一些微小而不能被鱼类直接利用的细菌和碎屑,进而其本身又被鱼类消化利用<sup>[6]</sup>。轮虫的游泳运动速度较慢,低于 $0.02\text{ cm/s}$ <sup>[7]</sup>,在养殖业育苗过程中,当鱼、贝、虾、蟹苗刚被孵出,卵囊已被消耗殆尽,此时还不能消化个体较大的外源性食物,轮虫则成为幼苗阶段的良好开口饵料<sup>[8]</sup>。自二十世纪六十年代轮虫首次作为仔鱼的开口饵料以来,许多海水鱼和淡水鱼的繁育获得了成功。国内外许多学者在轮虫的繁殖生态、饵料营养、培养技术等方面作了大量的试验研究,然而,随着海水和淡水人工育苗规模的不断扩大,对轮虫供应数量和培养稳定性的要求也越来越高,轮虫活饵料的培养已成为育苗生产的关键环节。

目前在生产上,轮虫的培养主要是依赖于传统的培养方法,培养密度很低(大约100个/mL),而且培养周期长,水体庞大和生产不稳定等因素增加了培养的难度<sup>[9]</sup>。为满足现代集约化育苗的需要,国内外科学家一直致力于在轮虫培养方法上进行研究和开

发，以期提高轮虫培养密度、营养价值、生产效率和培养系统的稳定性。轮虫的培养受很多因素的影响，如饵料、接种密度、温度、盐度、光照、pH、溶氧等，而且轮虫的培养是建立在一个生态体系中，各因子相互关联、相互影响<sup>[10]</sup>。在此期间，饵料是影响轮虫生长繁殖的最主要因子之一。本课题通过探测轮虫摄食微藻饵料的规律，探讨不同微藻对轮虫生长和摄食的影响。

近几年发展起来的生物包囊技术，利用轮虫作活载体，可以将幼苗所需的某些营养物质，各种不饱和脂肪酸、维生素等传递给幼苗<sup>[11]</sup>。通过强化培养将营养物质在轮虫体内富集。目前国内外有对轮虫营养强化的技术日益成熟，强化过程所用的饵料，通气量，温度等生长条件都有所研究。但目前对强化轮虫的微藻饵料的选择一直以单一藻类为主，对混合藻类的研究很少。单一饵料普遍存在营养不平衡、不能满足轮虫的营养需要、喂养效果差的问题，有的饵料还存在适口性差、含毒素等问题。为了合理利用各种饵料、提高饵料的利用效率和营养价值、提高饵料的综合性能，有必要将各种饵料进行合理搭配，以便在投喂中扬长避短，充分发挥各种饵料的优点，因此，配合饵料便成为集约化喂养、饵料工业化生产的必然选择。

所以通过投喂不同混合比例微藻饵料，检测比较轮虫体内营养成分（蛋白质，脂肪尤其是不饱和脂肪酸）的含量，探究混合微藻饵料对轮虫营养强化的效果，筛选出最佳饵料和饵料配比，提高轮虫的综合性能。

## 第一章 综述

### 1 淡水壶状臂尾轮虫的培养技术

#### 轮虫的培养方式

目前培养轮虫的方式主要有一次性培养,半连续性培养,室外大面积的土池培养[12-16]。

#### 1.1 一次性培养

一般用容器培养,室内室外均可,所用的容器一般为长方形的玻璃缸高 40cm,宽 20cm,用透明的塑料封顶,防止杂质和细菌流入缸内,缸要提前消毒,消毒的方法有用 300g/L 的高锰酸钾需 5~10min、用 3~5%的碳酸需 30 min、用 10%的盐酸需 5 min,常用的消毒剂是次氯酸,按 1L 的培养液加入 1~2mL 次氯酸,消毒时间为 24h,然后用硫代硫酸钠中和。接种轮虫,一般一次性培养轮虫的接种密度为 5~10 个/mL,通气培养,每日投饵。培养 7~8d 后,采收轮虫。采收后重新清池消毒,再重新培养。若干个轮虫培养容器按计划培养,轮流采收。这种方式培养的轮虫,密度一般在 500 个/mL 以上,目前最高密度是 2000 个/mL。这种培养方式保证轮虫质量和产量的稳定,但培养成本较高。

#### 1.2 半连续性培养

最少需要两个池,一个轮虫池,一个是藻种池,一般按轮虫池和藻种池为 1:1~1:2 的体积比例,能基本满足轮虫对单胞藻的需求。藻种池的大小以 0.5~1 亩为好,水深 80~100cm,目前培养的单胞藻的品种有小球藻、微绿球藻等,其中生长迅速又适合轮虫摄食与营养要求的是小球藻,它对温度和盐度的要求范围较广,易于培养,也适合土池培养。接种前,先培养藻类饵料,在轮虫的养殖过程中以单胞藻为主酵母为补充。轮虫的接种密度一般在 20~50 个/mL,充气培养,7~8d 后,每次按需求将轮虫用虹吸法连同轮虫培养液一起采收,采收后,把藻类培养池的藻液抽入轮虫培养池,补回采收的部分,恢复原来水位。约经 15~25d 的培养,将池底的轮虫粪便和残饵,利用虹吸法吸出,以保证培养池和水质干净。但经两三个培养月后,水质恶化,需要全部收获,清池,消毒,重新培养。这种培养方法培养轮虫的效率较高。

#### 1.3 室外土池培养

土池的有效水深一般在 1~1.2m,池底要平整,而且以不渗漏的泥质或泥沙质为好,堤坝要坚固,它的培养过程如下:

##### 1.3.1 清池

一种方法是先排干池水,清除污泥杂藻,暴晒 3~5d,即可达到目的。另一种方法

是池中带水消毒，最常用消毒药物是漂白粉，有效氯含量在 25~30%，用量为 60g/ m<sup>3</sup>，消毒时间 3~5d；也有用氨水，所用氨水含氮量 15~17%，用量为 250mg/L，消毒时间为 2~3d<sup>[17]</sup>。

### 1.3.2 进水

待池中的药物消失后，进水。进水必须通过 250-300 目以上的筛绢网过滤，首次进水时，先让水位达到 30cm 即可。

### 1.3.3 追加肥料培养单胞藻

所加的有机肥必须经过发酵，施加量为每公顷池加入 1500Kg 鸡粪和 30Kg 的尿素再加 7.5Kg 过磷酸钙，隔一天后再加水，当水位升至 50cm 时，接种轮虫，接种密度为 40~50 个/mL，每五到十天追施一次肥料，池中藻的密度不宜过大，控制在以透过池水可见池底为宜，因为藻细胞的密度过大不利于轮虫的生长和繁殖。

### 1.3.4 轮虫的采收

用 240 目筛绢做成长筒形，长 6~10m，直径 40cm，把电动浮泵固定在池中间小船上，筛绢一端套在泵口，让其充分伸展后，另一端固定在池边处，并用活结扎口，网袋用前需检查，或者用 250 目筛绢做成网箱，采用虹吸或水泵，把池水抽入网箱过滤，通过过滤来完成采收。也可利用轮虫的趋光性的特点，利用光诱，使轮虫大量聚集在光强处。轮虫集中的地方呈褐红色，可用水桶直接舀取<sup>[24]</sup>。

## 2 轮虫培养的过程中，注意的事项

### 2.1 接种

轮虫的接种密度依据轮虫种的多少而定，接种比例 0.1~10 个/ mL 均可，一般控制在 1~6 个/ mL。在生产中，接种密度一般为 2~100 个 / mL，以接种数量在 40~50 个 / mL 最为适宜。接种密度大，收获的时间就相应提前。而且接种温度与盐度与培养条件要保持基本相同<sup>[18]</sup>。

### 2.2 饵料

轮虫繁殖到一定数量后，摄食量很大，需要大量的单胞藻作为饵料及时满足轮虫繁殖需求，能否保证足量的单胞藻是轮虫培育成败的关键<sup>[19]</sup>。单胞藻还有调节水质，吸收氨氮，强化轮虫质量的作用。所以设置专门的单胞藻培养池，是轮虫持续高产的保证。单胞藻类主要用小球藻，一般每天上午投喂 1 次，以水体稍有颜色为好。从每个轮虫每天利用 10 万个细胞看，如果大批量培养轮虫，一般的育苗场家，单胞藻是不能满足供应的，所以可以给轮虫投喂酵母，酵母主要是食用的鲜酵母，投喂轮虫时将鲜酵母和小球藻混合，每天平均投喂 5 次，具体时间是早 4 时、上午 8 时、中午 1 时、下午 6 时、

晚10时30分。经实验证明饵料的投喂并不是多多益善,而要控制在一定的密度范围内,不要使饵料过剩,这样不仅是浪费资源,增高成本,而且多余的饵料能使水质变坏,造成污染<sup>[20]</sup>。

### 2.3 水质

壶状臂尾轮虫的耐盐度范围很广,轮虫的培养用水如果是自来水可直接用150g/L的次氯酸消毒24小时,再用硫代硫酸钠中和。如果是未经处理的湖水,必须先用300目筛绢网袋过滤,再用150g/L的次氯酸消毒24小时,最后用硫代硫酸钠中和,以防止敌害生物进入培养池。生产中除接种时不换水外,从培养的第3天起,每天换水量要达到25%。加注的新水水温尽量与轮虫池一致,温差在3℃以下。在冬季、早春采用升温培养的,要防止温差波动过大,升温幅度要小于10℃,否则会导致轮虫活力差、繁殖力下降、个体变小。

### 2.4 光照和通风

在轮虫培养过程中,早春光照对轮虫的影响不大,但在4月中旬后要注意通风,避免强光照射,使室温与水温基本一致,否则在轮虫接种3天后,会出现红褐色絮状物,镜检呈类似大型丝状角毛藻,而实际是投喂的酵母在高温下发酵与池内的单细胞藻缩聚形成的,这种情况出现后池底残留物加厚,水质变坏,池壁上出现红圈,轮虫个体瘦小,数量急剧下降,直至倒池<sup>[21]</sup>。轮虫光照强度一般为4400~10000lx之间。在溶解氧为2mg/L以上时,轮虫繁殖良好,轮虫对低氧含量甚至短时间缺氧的耐受性很强。

### 2.5 轮虫的营养强化

用酵母培养的轮虫,优点是繁殖速度快,在数量上能满足大规模育苗生产的需要,但其不含不饱和脂肪酸,若直接用于育苗生产,效果很差,为此,必须用单胞藻对轮虫进行营养强化。从目前的实践看,用小球藻效果最好。具体方法是:根据生产需要,将达到投喂要求的单细胞藻按水:饵1:3的比例打到强化池,充气后再把所需轮虫用淡水浸泡3~5分钟后,接到强化池,密度为400~500个/毫升,强化24小时即可投喂幼苗<sup>[22]</sup>。

### 2.6 轮虫的收获

如果水温较低,轮虫繁殖较慢,虽然市场需求大而且价格高,也只能少量收获。一般水温10~15℃时,日收获量为存池量的1/10左右。水温较高,轮虫繁殖快可大量收获,一般日收获量为存池量的1/6~1/3左右<sup>[23]</sup>。另外,当轮虫产量高峰出现时应及时大量收获轮虫,并补充饵料和水,以维持种群的持续生长。收获时间:一般清晨较好,因为下午水温较高轮虫集中产卵,水体中粘性物质增多,同时由于下午水体中的溶解氧常过饱和,在抽滤时易使筛绢通透性降低,从而在袋内形成大量泡沫,影响效率及产品质量<sup>[25]</sup>。

### 2.7 病害防治

轮虫的敌害很多,主要有甲壳动物、多毛类幼体、大型原生动物和丝状藻类等。在轮虫土池培养中,一旦发现敌害,可分别采取以下措施处理(1)甲壳动物,包括桡足类、枝角类、钩虾等,通常大型的桡足类不好杀灭,敌百虫浓度要达到 $1.5\text{g}/\text{m}^2$ ,其它种类 $1\text{g}/\text{m}^2$ ,可杀灭,而轮虫可正常繁殖。(2)多毛类:对轮虫繁殖危害极大,可用 $10\text{g}/\text{m}^2$ 茶籽饼浸泡后全池泼洒。4月中旬后,多毛类的卵随水进入池内,此时,必须将水用浓度为 $30\text{mg}/\text{Kg}$ 的漂白粉消毒,并用硫代硫酸钠中和后再用。若出现多毛类幼体,也可采用80目筛绢网过滤。(3)大型原生动物:主要有变形虫等,一旦污染,轮虫就会绝产。防治措施是防止水源污染,培育用水及加水要经消毒,如果大量暴发,把池水排空,彻底清池,消毒,重新接种培育。(4)聚缩虫,由于轮虫要投喂酵母,因而池中有机质丰富,为聚缩虫的生长繁殖提供了大量的饵料和附着基。在温度适宜时( $22\sim 24^\circ\text{C}$ ),聚缩虫大量繁殖,给育苗带来很大的影响。预防的主要措施是大量换水,重新接种培育。具体方法:先停气20分钟,使聚缩虫下沉到池底,利用虹吸作用收集轮虫,再用80目筛绢网过滤,重新接种培养或强化后投喂,或者用浓度为 $(12.5\sim 15)\times 10^{-6}$ 的甲醛溶液,在 $2\sim 4\text{d}$ 内能有效杀灭聚缩虫的成体,轮虫的种群增殖速度保持持续增长。(5)丝状藻类:它可使池水变清,消耗营养盐,防治方法是搅动池底使池水保持浑浊。如果大量发生,可人工捞取或弃水重新培养。

## 3 轮虫的应用及营养成分的分析

### 3.1 轮虫的应用

#### 3.1.1 净水作用

约翰·沃尔什发现轮虫的轮形器官造成水的旋动,使水流向轮虫的头部前端,轮虫捕食水流卷来的藻类、小型原生动物等各种小生物体,是水内不至于有过多的有机物停滞而造成水质污染<sup>[26]</sup>。轮虫的废弃产物会结合成粘性团块,吸附住其他有机物的颗粒,并使其沉淀到水底,从而净化水质,在本课题中,针对轮虫的这一作用,将轮虫运用于富营养化的治理,测得轮虫对微藻摄食量<sup>[27]</sup>。

#### 3.1.2 轮虫作指示生物

目前,造成环境污染的原因有自然污染和人为污染,其中以人为污染中的化学污染最为突出。随着工农业的发展,大量的金属离子污染物通过各种途径进入水体,导致了水体的严重污染,这些污染物对水生生物都有毒害作用,并通过食物链间接危害人类的健康,当重金属进入人体后,会逐渐累积,引起慢性中毒、致癌、致畸等损害<sup>[28]</sup>。20

世纪 90 年代, 国际上开展了轮虫生态毒理学的系统研究, 并且已经将轮虫作为检测生物应用到环境毒物的检测中。许多学者已将轮虫作为水环境监测的指示生物群落, 并用轮虫群落生态来评价水质受污染状况和水体营养状况。轮虫被作为一种指示生物运用到污水的监测中<sup>[29]</sup>。如今轮虫在水质监测方面的作用越来越受到人们的重视, 有人曾研究过不同污染等级的污水中, 出现的轮虫种类不同。

轮虫还被用来作为生态毒理试验的指标, 有毒有害化学物质对环境的污染已成为全球性问题, 其对水生生物的毒害乃至对生态系统的影响已引起广泛关注。轮虫在水生生态系统中是一个重要的浮游生物种群, 在食物链中的营养传递及水体生态的稳定性方面扮演重要的角色, 而且轮虫对被测试化学物质敏感。

因此, 以轮虫作为模式生物之一进行毒理试验, 分析预测各种有毒有害物质和极端环境对水生生物的毒理效应, 已得到大量的应用<sup>[30]</sup>。水体中的有毒有害物质会通过影响轮虫的生长、繁殖等指标体现, 而且轮虫的分类、生态、生理、遗传等资料相对齐全, 能在实验室条件下进行大规模培养, 休眠卵易得, 保证了试验动物的稳定性。

### 3.2 饵料对轮虫营养成分的影响

轮虫的培养日益受到水产工作者的重视, 轮虫的培养技术不断进步, 尤其是近几年利用轮虫这个活载体, 可以将幼苗所需的蛋白质, 不饱和脂肪酸尤其是EPA和DHA等营养物质传递给幼苗<sup>[31]</sup>。

微藻不仅具有丰富的不饱和脂肪酸, 而且易于培养, 但是目前的工作多限于对单一饵料效果的研究, 缺乏多种混合饵料效果的比较。但目前对强化轮虫的微藻饵料的选择一直以单一藻类为主, 对混合藻类的研究很少<sup>[32]</sup>。单一饵料普遍存在营养不平衡、不能满足轮虫的营养需要、喂养效果差的问题, 有的饵料还存在适口性差、含毒素等问题。为了合理利用各种饵料、提高饵料的利用效率和营养价值、提高饵料的综合性能, 有必要将各种饵料进行合理搭配, 以便充分发挥各种单一饵料的优点, 因此, 配合饵料便成为集约化喂养、饵料工业化生产的必然选择<sup>[33,65,66]</sup>。

### 3.3 轮虫的营养成分

轮虫体内蛋白质含量约占其干重的28%-63%, 脂类占9%-28%<sup>[34]</sup>。单纯以面包酵母为食物培养的轮虫, 其总脂类含量低于以藻类或藻类和其它食物混合培养的轮虫, 延长藻类或经脂类强化的酵母的投喂时间可提高轮虫的脂类含量。通过对不同饵料条件下培养的轮虫进行成分测定, 探讨不同饵料对轮虫体的营养成分的影响, 得出不同的微藻饵料对轮虫营养强化的效果, 选择出轮虫的最适饵料, 以此强化轮虫, 充分发挥轮虫这个活载体的作用, 将幼苗所需的某些营养物质、各种不饱和脂肪酸、维生素等传递给幼苗, 为

水产养殖提供更优质的生物饵料<sup>[35]</sup>。

### 3.4 问题与展望

轮虫作为经济水生动物幼苗的一种关键饵料，轮虫养殖的产业化将为水产养殖提供优质饵料，推进水产养殖业的发展。随着水产养殖业的方展，要求轮虫的品质和质量不断提高。首先，应研制一种轮虫的高密度培养装置，该装置的特点应价廉、易操作，并有稳定的轮虫产生，该装置的核心问题是研制培养反应器及控制装置，筛选适合高密度、工厂化培养的轮虫品种。其次，应研制专门生产休眠卵的装置。由于活体轮虫的运输成本高、技术难度大，难以保证轮虫的及时供应，影响育苗生产，而轮虫的休眠卵可在低温、干燥下长期储藏，适合长途运输等多种运输和销售方式，集中生产销售休眠卵，且由其自行培育和生轮虫，是轮虫实现产业化的可行模式。

## 第二章 轮虫对微藻摄食情况的研究

### 1 轮虫对两种微藻饵料的摄食量

#### 1.1 材料与方法

##### 1.1.1 材料

小球藻 (*Chlorella vulgaris*), 细胞直径为 3-5  $\mu\text{m}$ ; 聚球藻 (*Synechococcus sp.*), 细胞宽 0.7-1.1  $\mu\text{m}$ , 长 1.8-2.1  $\mu\text{m}$ , 用自然光照下, 培养温度为 20-24 $^{\circ}\text{C}$ 。藻液经 250 目的筛绢过滤, 以去除藻液中的絮凝。

轮虫: 采自山东烟台, 鲁东大学校边池塘, 所采水样首先用多层纱布滤去其中的枝角类和挠足类等大型浮游动物及杂质, 然后置于解剖镜下观察, 用微吸管吸出其中的壶状臂尾轮虫并接种到事先准备好的轮虫培养液中进行培养。实验时先用纱布过滤, 去除在培养轮虫的过程中产生的轮虫废弃物和剩余饵料的絮凝, 再用 300 目的筛绢滤取轮虫, 并用蒸馏水洗轮虫数次, 放入蒸馏水中预养 4-5 小时<sup>[36]</sup>。

##### 1.1.2 计数方法

采用血球计数板计取微藻的浓度, 计数三次取平均值。轮虫先用碘液固定, 然后在解剖镜下计数, 同样计数三次取平均值。

##### 1.1.3 计算方法

轮虫的日平均摄食量=(微藻原来的浓度-实验后微藻的浓度)/轮虫的浓度

取轮虫实验前的浓度求得的轮虫的日平均摄食量则为最大值

取轮虫实验后的浓度求得的轮虫的日平均摄食量则为最小值

轮虫的日增长率= $(\ln N - \ln N_0) / (t - t_0)$  式中:  $N$  和  $N_0$  分别表示增殖计算开始和计算结束时轮虫的培养密度;  $t$  和  $t_0$  分别表示增殖计算开始和计算结束时的时间<sup>[37]</sup>。

#### 1.2 方法与结果

##### 1.2.1 轮虫在不同条件下对两种微藻的日摄食和轮虫密度的变化

各取如下浓度的小球藻 100mL 加入轮虫预养液 10mL, 接种轮虫的密度为 3 个/mL, 置于 25 $^{\circ}\text{C}$  的恒温培养箱, 控制光照 (连续光照 12 小时/天), 设置无光照组为对照组。各取一定浓度的聚球藻 100mL 同样加入轮虫预养液 10mL, 同样设置两个对照组 (光照、

黑暗), 两实验组的所得数据如表 1、表 2 (每个处理重复 3 遍, 取平均值)。

表 1 自然条件下微藻以及轮虫的密度

Table 1 The density of algae and rotifer under natural condition

微藻的种类	时间	藻的浓度(个/ml)	轮虫的浓度(个/ml)
小球藻组	0h	$1.27 \times 10^6$	3.0
	24h	$1.10 \times 10^6$	5.0
聚球藻组	0h	$2.17 \times 10^6$	3.0
	24h	$1.98 \times 10^6$	4.0

由表 1 可得在自然条件下每只轮虫对小球藻的日平均摄食量为 34000—63000 个, 轮虫的日生长率为 2.3 个/mL; 每只轮虫对聚球藻的日平均摄食量为 47500—69600 个, 轮虫的日生长率为 1.3 个/mL。

表 2 黑暗条件下微藻以及轮虫的密度

Table 2 The density of metallothionein transgenic *Synechococcus sp*, *Chlorella* and rotifer under dark condition

微藻的种类	时间	藻的浓度(个/ml)	轮虫的浓度(个/ml)
小球藻组	0h	$1.27 \times 10^6$	3.0
	24h	$0.90 \times 10^6$	4.0
聚球藻组	0h	$2.17 \times 10^6$	3.0
	24h	$1.82 \times 10^6$	3.0

由表 2 可得在黑暗条件下每只轮虫对小球藻的日平均摄食量为 92000—140000 个, 轮虫的日生长率为 1.3 个/mL; 每只轮虫对聚球藻的日平均摄食量为 117000—128000 个, 轮虫的日生长率为 0.3 个/mL。

### 1.2.2 在不同浓度的小球藻中, 轮虫在不同条件下的日摄食量

设置两个对照组, 自然条件下和黑暗条件下, 每组设浓度分别为原液, 稀释为 1.5 倍、2 倍、2.5 倍、4 倍这五种浓度梯度的小球藻各 100mL, 加入轮虫的预养液 50 mL, 接种密度为 6.8 个/mL。由于轮虫繁殖一代的时间是 24 小时, 所以取轮虫日摄食量的最大值为参数, 对比在不同浓度的小球藻中, 轮虫在不同条件下的日摄食量。

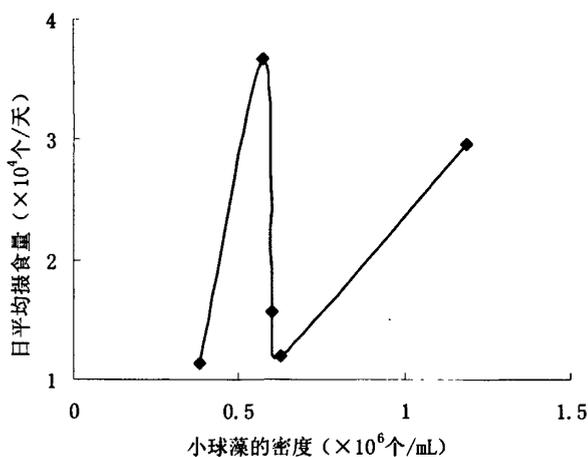


图 1、在自然条件下轮虫在不同浓度的小球藻中的日摄食量

Fig.1 Variation food consumption of the different density of algae under natural condition

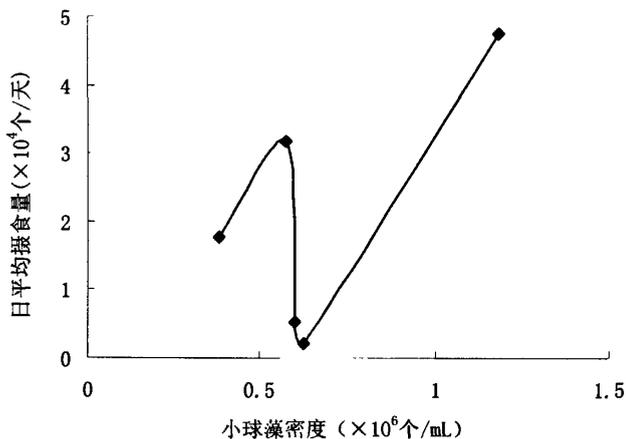


图 2、在黑暗条件下轮虫在不同浓度的小球藻中的日摄食量

Fig.2 Variation food consumption of the different density of algae under dark condition

小球藻浓度低于  $0.573 \times 10^6$  个/mL 时, 随着藻浓度的增加, 轮虫的摄食量也增加, 当小球藻的浓度达到  $0.573 \times 10^6$  个/mL 时, 自然和黑暗培养条件下轮虫的日摄食量均出现峰值分别为 36700 个/天、31600 个/天。当小球藻的浓度增加时, 轮虫的摄食量降低, 当浓度增到  $0.625 \times 10^6$  个/mL, 摄食量开始回升, 随着小球藻浓度的增大, 轮虫的日摄食量也越大。

### 1.2.3 干重试验

分别取浓度为  $8.45 \times 10^5$  个/mL 的小球藻和浓度为  $3.11 \times 10^6$  个/mL 转基因的聚球藻各 20 mL, 放入称量皿, 在鼓风干燥箱中干燥至恒重, 得到每个小球藻的干重约为  $2.96 \times 10^{-9}$  g, 每个聚球藻的干重约为  $1.54 \times 10^{-9}$  g, 所以自然条件下轮虫日摄食小球藻的质量为  $1.01 \times 10^{-4}$ — $1.85 \times 10^{-4}$  g; 日摄食聚球藻的质量为  $7.32 \times 10^{-5}$ — $1.07 \times 10^{-4}$  g。虽然摄食的聚球藻的细胞个数大于摄食的小球藻, 但摄食小球藻的重量大于所摄食的聚球藻。

### 1.3 讨论

#### 1.3.1 在不同环境条件下轮虫的日摄食量

由本实验得知轮虫在自然光照条件下的日摄食量要远小于在黑暗条件下的, 原因是在自然光照条件下, 微藻的繁殖速度比在黑暗条件下大的多, 所以微藻数量减少得慢。试验之所以设计黑暗条件, 意在创造无光条件抑制微藻的繁殖<sup>[38]</sup>, 旨在得到轮虫摄食微藻的理论速率。

#### 1.3.2 不同饵料的投喂效果

上述实验的结果显示, 轮虫摄食小球藻的个数小于所摄食的聚球藻, 原因是聚球藻的细胞比小球藻小很多, 而实验所用的聚球藻密度较高, 轮虫又是滤食性, 所以摄食聚球藻的个数多。但由上述实验的数据显示用聚球藻投喂的轮虫其生长率远小于采用小球藻投喂的轮虫的生长率。

#### 1.3.3 不同饵料浓度对轮虫摄食量的影响

小球藻浓度为  $0.573 \times 10^6$  个/mL 时, 在自然光照和黑暗两种培养条件下轮虫的日摄食量均出现峰值分别为 36700 个/天、31600 个/天, 分析原因可能是小球藻在此浓度下较适宜轮虫的生长繁殖<sup>[39]</sup>, 增加了轮虫的摄食量。而且两种条件下的摄食量差异不显著 ( $P > 0.05$ )。在实验的浓度范围内, 当浓度增到  $0.625 \times 10^6$  个/mL, 随着小球藻浓度的增大, 轮虫的日摄食量也越大。原因可能与轮虫的摄食习性有关, 轮虫是一种滤食性浮游动物, 利用头冠的纤毛不停摆动来游泳和摄食, 所以当小球藻的浓度越大, 在单位时间单位体积的藻液中轮虫的摄食量越大。当微藻的密度增到一定的范围, 随着藻密度的增大轮虫生长繁殖也加快<sup>[40]</sup>, 增加了对微藻的摄食量。

#### 1.3.4 在不同条件下轮虫的生长速度

由上述实验可得轮虫在自然光照条件下的生长速度大于在黑暗条件下轮虫的生长速度, 原因分析由王家楫的研究表明, 轮虫是具有眼点的浮游动物, 其眼点由神经与脑相

连,眼点含有红色素,所以光照对轮虫也有直接作用,在光照的条件下,更有利于轮虫摄食<sup>[41]</sup>。光照还可促进微藻的光合作用产生氧气,改善水质状况,进而促进了轮虫的生长,另一方面,良好的光照条件又有利于微藻的繁殖,不断地补充培养过程中轮虫消耗的饵料,促进轮虫的生长,而且在光照条件下轮虫游泳活泼,增加了能量的消耗,增加食物的消化速率。

### 1.3.5两种饵料的干重实验

由上述实验的结果表明,轮虫的摄食量与饵料细胞的大小和密度有关,轮虫每天摄食的聚球藻细胞数大于所摄食的小球藻<sup>[42]</sup>,但摄食小球藻的质量大于聚球藻的质量,轮虫并没有因为每天所摄食的饵料的质量达到一定时,而停止滤食,这可能与轮虫摄食习性<sup>[43]</sup>有关,由于纤毛不断的运动,食物随水流进入口腔,口腔下有发达的咀嚼器,咀嚼器不论有没有食物吞下去,总是不断的运动,所以轮虫的摄食量与饵料的密度有非常密切的关系。

## 2 轮虫对不同微藻摄食情况的研究

### 2.1 材料

小球藻(*Chlorella vulgaris*)的细胞球形,细胞直径为 5-10  $\mu\text{m}$ 。衣藻(*Chlamydomonas sp.*)的植物体圆形,细胞直径为 5-13  $\mu\text{m}$ 。水华鱼腥藻(*Anabaena flos-aquae*)的植物体呈丝状,细胞椭圆或球形,宽 4-8  $\mu\text{m}$ ,长 6-8  $\mu\text{m}$ 。异形胞椭圆形宽 4-9  $\mu\text{m}$ ,长 6-10  $\mu\text{m}$ ;孢子略弯曲,宽 6-13  $\mu\text{m}$ ,长 20-50  $\mu\text{m}$ 。上述三种微藻均由鲁东大学经济藻种库提供。转金属硫蛋白基因聚球藻(*Synechococcus sp.*)的细胞圆柱形或长圆形,细胞宽 0.7-1.1  $\mu\text{m}$ ,长 1.8-2.1  $\mu\text{m}$ 由北京大学茹炳根教授提供。

壶状臂尾轮虫(*Brachionus urceus*)采自池塘,经分离纯化后培养<sup>[44]</sup>。

### 2.2 实验方法

2.2.1 微藻的培养方法:四种藻采用自然光照(白天光照为 1000—10000lx,夜间光照小于 1lx)温度为 20-24℃的条件下培养。实验时将藻液用 300 目的筛绢过滤,以去除藻液中的絮凝。

2.2.2 轮虫的处理方法：用纱布过滤，去除轮虫在培养过程中产生的废弃物和剩余饵料的絮凝，再用 300 目的筛绢滤取轮虫，并用蒸馏水冲洗轮虫数次，放入蒸馏水中预养 4-5h<sup>[45]</sup>。

2.2.3 计数方法：用分光光度计测 560nm 波长藻液的 OD 值。所用仪器为 UV-2000 型紫外分光光度计（尤尼柯[上海]仪器有限公司）

2.2.4 轮虫对微藻的摄食情况

分别取四种不同的微藻液各 100mL，加入 10mL 轮虫的预养液，接种轮虫密度为 25 个/mL。取这四种藻液 100mL，加入 10mL 蒸馏水，设为对照组。置于 25℃ 的恒温培养箱，控制光照（连续光照 12 小时/天）。设置无光照组为对比实验。每隔 24h 测一次 OD 值，每个处理重复 3 次。

2.2.5 各种微藻密度的标准曲线的制备

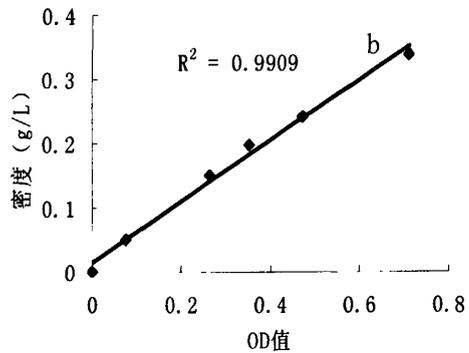
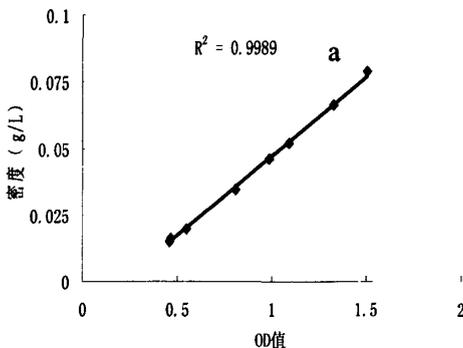
配置不同浓度的藻液各 100 mL，测 OD 值，离心后在鼓风干燥箱里烘至恒重，得到干重 (g/L)。每个处理重复三遍，取平均值，做标准曲线。如图 3

2.2.6 干重的测定方法

取待测微藻测 OD 值，根据标准曲线得出密度，每个处理重复三遍，取平均值。

## 2.3 结果

### 2.3.1 各种微藻的标准曲线



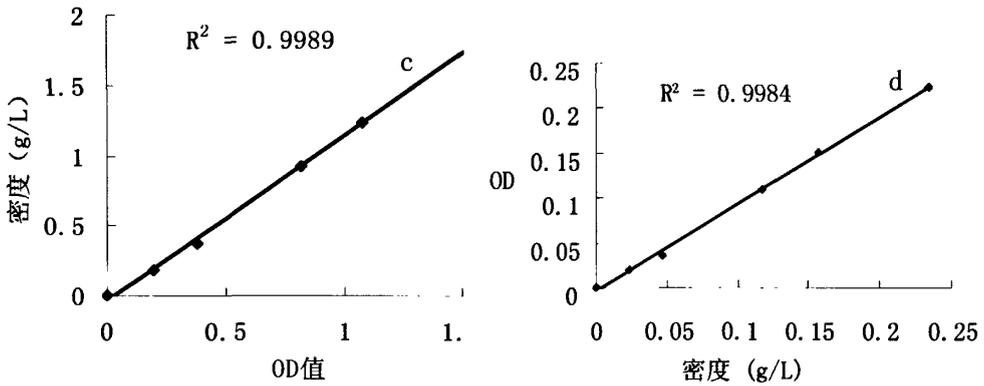


图 3 标准曲线

Fig.3 Standard curve of different algae

a 小球藻 *C.vulgaris* ; b 衣藻 *C. sp.*; c 鱼腥藻 *A.f*, d 聚球藻 *S.sp.*,

### 2.3.2 自然光照条件各组微藻的密度变化

在自然光照条件下，微藻的自然生长及其藻液中投入轮虫后，其密度变化如图 4、图 5。衣藻和鱼腥藻在 5d 后，进入指数生长期，小球藻和聚球藻的生长处在平稳期。投入轮虫后，微藻的生长受到抑制，且密度迅速减少，6d 后，小球藻的 OD 值由 0.428 降到 0.097；聚球藻的 OD 值由 0.949 降到 0.232；衣藻的 OD 值由 0.592 降到 0.072；鱼腥藻的 OD 值由 0.533 降到 0.413。

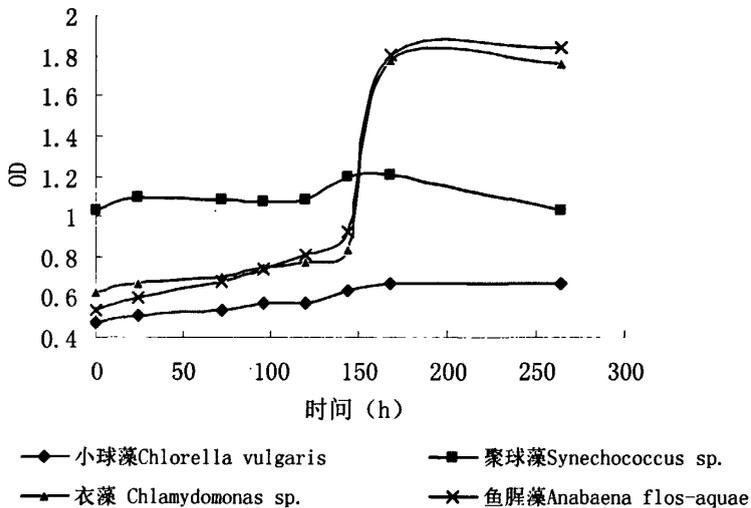


图 4 自然光照条件下微藻的密度变化

Fig.4 Variation curve of density of algae under natural condition

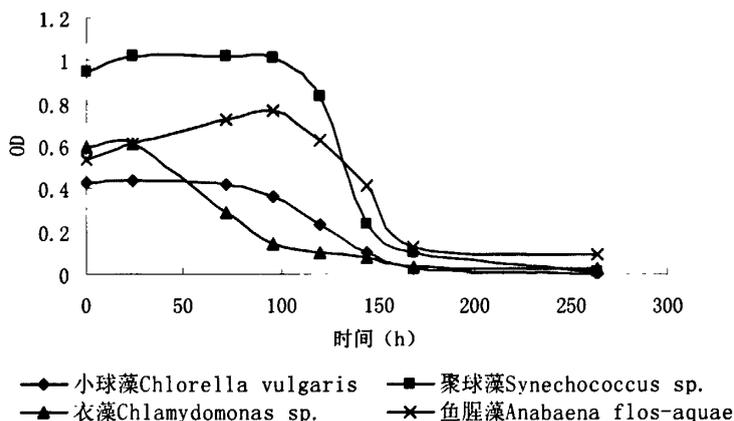


图 5 自然条件下投入轮虫后微藻的密度变化

Fig.5 Variation curve of density of algae under natural condition with rotifers

### 2.3.3 黑暗条件下各组微藻的密度变化

在黑暗条件下，微藻的自然生长及在其藻液中投入轮虫后，其密度变化如图 6、7。黑暗条件下，这四种藻的生长受到不同程度的抑制，而鱼腥藻最为严重，小球藻和聚球藻的生长则几乎没有受到抑制。投入轮虫后，小球藻的 OD 值由 0.428 降到 0.104；聚球藻的 OD 值由 0.949 降到 0.597，藻液仍曾蓝绿色；衣藻的 OD 值由 0.592 降到 0.041；鱼腥藻的 OD 值由 0.522 降到 0，藻体死亡。

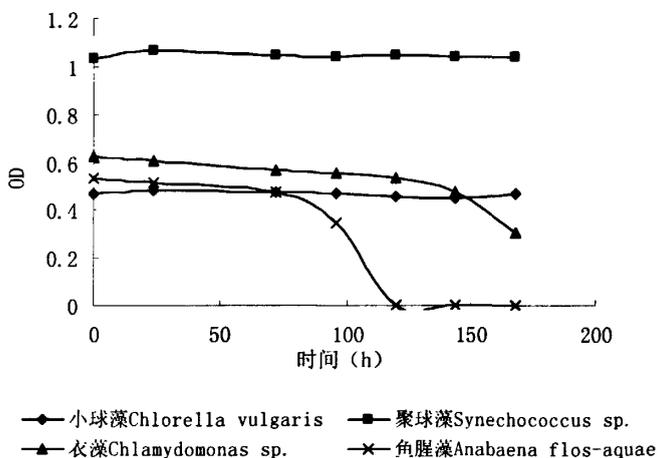


图 6 黑暗条件下微藻的密度变化

Fig.6 Variation curve of density of algae under dark condition

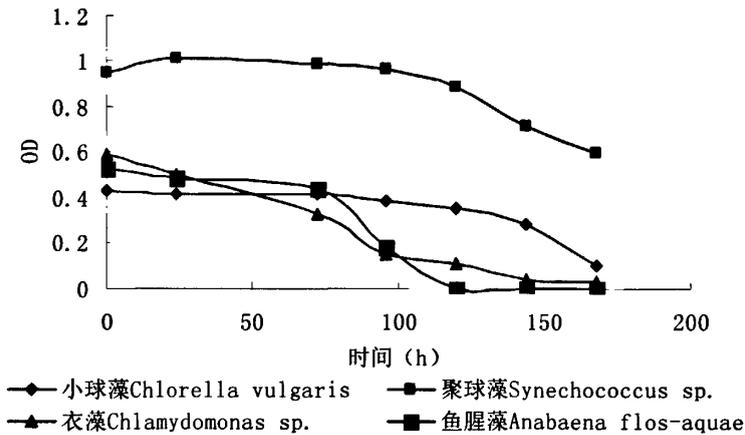


图 7 黑暗条件下投入轮虫后微藻的密度变化

Fig.7 Variation curve of density of algae under dark condition with rotifers

## 2.4 讨论

上述实验表明, 6d 的时间里, 自然光照条件下, 轮虫可以将小球藻的密度由 0.175 g/L 降为 0.002g/L, 将聚球藻的密度由 1.112g/L 降到 0.237g/L, 将衣藻的密度由 0.31g/L 降到 0.048g/L, 鱼腥藻的密度由 0.531 g/L 降到 0.069 g/L; 在黑暗条件下, 这几种藻的生长受到抑制, 经轮虫的摄食可使小球藻的密度由 0.175g/L 降为 0.006g/L, 聚球藻的密度由 1.112g/L 降为 0.666g/L, 衣藻的密度由 0.31g/L 降到 0.033g/L, 鱼腥藻的密度由 0.531 g/L 降到 0.00 g/L。所以在自然条件下, 轮虫可以将小球藻、聚球藻、衣藻、鱼腥藻的密度分别减少 0.173 g/L、0.875 g/L、0.262 g/L、0.453 g/L。黑暗条件下轮虫可将小球藻、聚球藻、衣藻密度分别减少 0.169 g/L、0.446 g/L、0.277 g/L, 鱼腥藻的密度减少不明确, 因为在黑暗条件下, 鱼腥藻的生长繁殖受到严重的抑制, 几天后藻体死亡。轮虫摄食聚球藻的量最大, 聚球藻的细胞个体最小、浓度最大, 摄食小球藻的量最小, 小球藻的细胞个体较大、浓度也最低。所以饵料浓度的不同, 轮虫所摄食的量也不同, 因为不同饵料对轮虫种群繁殖的影响不同。但实验结果显示, 自然光照条件下, 对照组第 5d 衣藻和鱼腥藻进入指数生长期, 但是加入轮虫的实验组在相同的时间里, 各微藻的生长受到严重的抑制, 水质渐变澄清, 瓶底形成土黄色的絮凝沉淀物。轮虫能有效的降低水体中微藻的含量, 维持生态系统的平衡, 降低富营养化造成的污染<sup>[46]</sup>。

## 第三章 不同微藻对轮虫增殖率的影响

### 1 实验材料

小球藻(*Chlorella vulgaris*)的细胞球形,细胞直径为 5-10  $\mu\text{m}$ 。衣藻(*Chlamydomonas sp.*)的植物体圆形,细胞直径为 5-13  $\mu\text{m}$ 。水华鱼腥藻(*Anabaena flos-aquae*)的植物体呈丝状,细胞椭圆或球形,宽 4-8  $\mu\text{m}$ ,长 6-8  $\mu\text{m}$ 。异形胞椭圆形宽 4-9  $\mu\text{m}$ ,长 6-10  $\mu\text{m}$ ;孢子略弯曲,宽 6-13  $\mu\text{m}$ ,长 20-50  $\mu\text{m}$ 。上述三种微藻均由鲁东大学经济藻种库提供。转金属硫蛋白基因聚球藻(*Synechococcus sp.*)的细胞圆柱形或长圆形,细胞宽 0.7-1.1  $\mu\text{m}$ ,长 1.8-2.1  $\mu\text{m}$ 由北京大学茹炳根教授提供。

壶状臂尾轮虫(*Brachionus urceus*)采自池塘,经分离纯化后培养。

### 2 实验方法

#### 2.1 实验材料的处理方法

微藻的培养方法:四种藻采用自然光照(白天光照为 1000—10000lx,夜间光照小于 1lx)温度为 20-24 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下培养。实验时将藻液用 300 目的筛绢过滤,以去除藻液中的絮凝。

轮虫的处理方法:用纱布过滤,去除轮虫在培养过程中产生的代谢废物和剩余饵料的絮凝,再用 300 目的筛绢滤取轮虫,并用蒸馏水冲洗轮虫数次,放入蒸馏水中预养 4-5h。

计数方法:先用碘液将轮虫固定,然后在解剖镜下计数,计数三次取平均值。

#### 2.2 不同微藻对轮虫生长率的影响

分别取四种不同的微藻液各 100mL,加入 10mL 轮虫预养液,接种轮虫密度为 25 个/mL。置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱,控制光照(连续光照 12 小时/天)。设无光照组为对照组。每隔 24h 对轮虫进行计数,每个处理重复 3 次。

### 3 实验结果

光照条件下, 摄食小球藻, 聚球藻, 衣藻, 鱼腥藻的轮虫, 达到最高密度分别为 450 个/mL、52 个/mL、280 个/mL、430 个/mL。投喂小球藻组, 轮虫的种群密度最高, 其次是鱼腥藻组, 聚球藻最差。在 7d 的时间内, 小球藻组和鱼腥藻组, 轮虫的密度连续增大, 之后开始衰退, 而衣藻组的轮虫密度在第 5d 就开始衰退, 但之前的同期增长明显高于其他组。聚球藻组的轮虫只是在第 3d, 密度有微小的增加, 但之后就开始衰退。四种微藻投喂的轮虫种群密度效果差异极显著( $P < 0.01$ )。

黑暗条件下, 投喂小球藻的轮虫, 在第 7d 种群密度达到最高为 110 个/mL; 摄食聚球藻的轮虫, 密度由 25 个/mL 降到 0 个/mL, 无种群密度增加的现象; 摄食衣藻的轮虫, 在第 4d 种群密度达到最高为 120 个/mL, 同期的种群密度高于其他组。摄食鱼腥藻的轮虫, 种群密度有降无升。黑暗条件下, 衣藻的投喂效果最好。四种微藻投喂的轮虫种群密度效果差异极显著( $P < 0.01$ )。

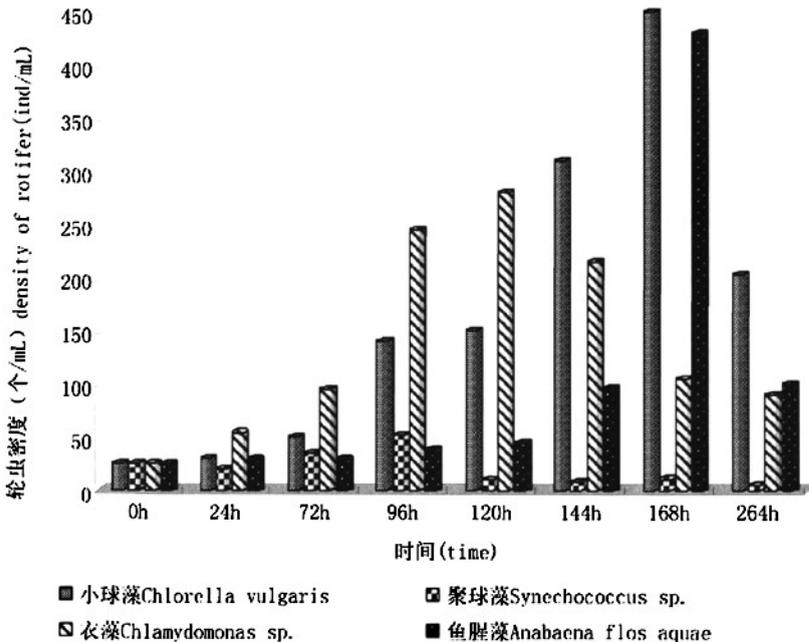


图 8 在自然条件下不同饵料对轮虫密度的影响

Fig.8 Effect of algae species on growth of rotifer under nature light

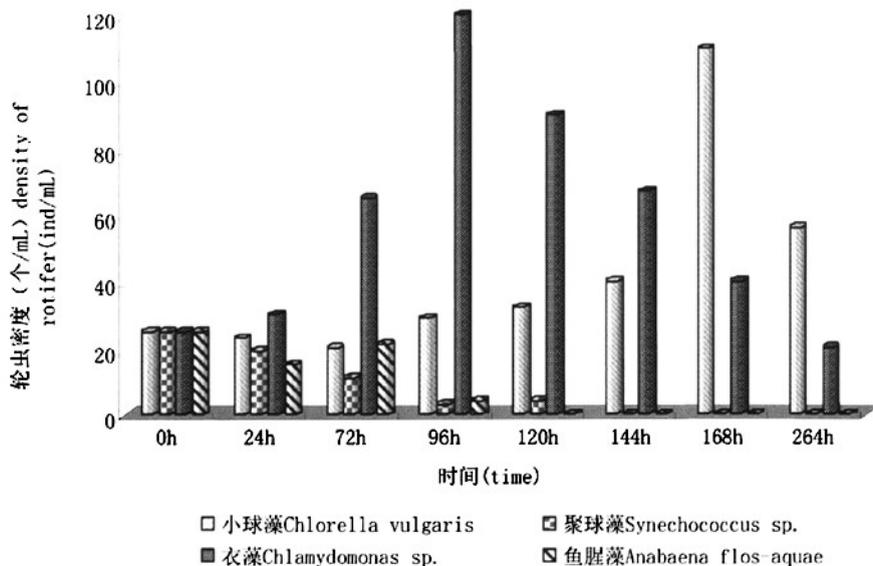


图9 黑暗条件下不同饵料对轮虫密度的影响

Fig.9 Effect of algae species on growth of rotifer under dark condition

## 4 讨论

### 4.1 饵料种类对轮虫生长的影响

两种培养条件下, 小球藻的饵料效果均优于其他三种。衣藻作为饵料的适宜时间是3-4d, 轮虫在投喂衣藻的情况下, 短时间内轮虫密度大量增加, 但是即便在饵料充足的情况下, 轮虫在衣藻中的生长繁殖周期依然很短, 而且会产生大量的卵。但黑暗条件下, 衣藻的饵料效果最好, 衣藻是单细胞绿藻, 细胞质内有大量卵圆形叶绿体, 其中含有叶绿素, 有光时可以进行光合作用, 自己制造有机物。有研究表明衣藻具有光系统II (P S II) 和无光系统I (P S I), 可以利用空气中的二氧化碳作为碳源进行光合自养生长, 在无光的条件下, 无光系统I 发挥作用使其光合自养作用非常稳定, 足以能维持一段时间的细胞生长及代谢<sup>[47]</sup>。将轮虫置于聚球藻中, 轮虫的密度迅速减少, 在实验中发现较低浓度的聚球藻比高浓度的聚球藻更有利于轮虫的增殖。本实验用的水华鱼腥藻不含毒素, 实验中发现, 用水华鱼腥藻培养轮虫时, 易管理、效果好, 这对大规模培养轮虫有实际意义, 另据研究报道, 鱼腥藻在不同的季节表现出较强的适应性和较高的生产率, 鱼腥藻作为水产养殖动物的饵料具有相当大的应用前景。因此, 水华鱼腥藻是一种开发潜力较大的种类, 对其研究既有理论意义, 又有实际价值。

## 4.2 不同条件对轮虫生长情况的影响

轮虫在自然光照条件下的生长优于在无光条件下，多数人确信光照对轮虫有性生殖的出现虽没有直接的诱导作用，但对轮虫的生长发育无疑是有利的，会间接影响到卵的形成。原因是光照的条件下，藻类生理活动正常，可以有效的进行光合作用，提供充足的氧气，产生有机物等营养物质，为轮虫提供了优良的生长条件<sup>[48]</sup>。从上述实验可见，藻类在黑暗的条件下，密度变化不大，黑暗条件下三种藻无法正常生长，水体中氧气减少，代谢废物浓度增高，饵料的浓度下降，从而抑制了轮虫的生长。黑暗条件下，除衣藻外，其他三种藻都是在投入轮虫的 96h 后开始大量减少，而之前密度变化不大，原因可能是轮虫到了一个新的环境条件下，有一段适应时间。

## 第四章 相关因素对轮虫培养的影响

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

轮虫(*Brachionus urceus*), 采自山东烟台鲁东大学周边池塘, 经分离纯化培养, 实验时先用纱布过滤, 去除在培养轮虫的过程中产生的废弃物和剩余饵料的絮凝, 再用300目的筛绢滤取轮虫, 并用蒸馏水洗轮虫数次, 放入蒸馏水中预养4-5小时<sup>[36]</sup>。

小球藻, 鲁东大学经济藻种库提供, 室温条件下, 自然光照培养。

#### 1.2 方法

##### 1.2.1 温度对轮虫增殖率的影响

每组取体积为500mL的小球藻液, 接种轮虫的密度为25ind/mL, 设7个温度梯度, 21℃, 23℃, 25℃, 27℃, 28℃, 30℃, 32℃, 置于相应温度的恒温培养箱, 控制光照(12h/天), 培养48h后对轮虫进行计数。每个处理重复三次。

##### 1.2.2 pH值对轮虫增殖率的影响

同样每组取体积为500mL的小球藻液, 接种轮虫的密度为25ind/mL, 设9个pH梯度, 3.5、4.5、5.5、6.5、7.5、8.5、9.5、10.5和11.5, 置于恒温(28℃)培养箱, 控制光照(12h/天), 培养48h后对轮虫进行计数。每个处理重复三次。

##### 1.2.3 携卵率对轮虫增殖率的影响

设4个平行组, 取5mL的小球藻液放入青霉素小瓶, 每组接种10个轮虫, 计数48h前、后的轮虫及卵的个数。

##### 1.2.4 计算方法

轮虫增殖倍率=培养后的轮虫密度-接种时的轮虫密度/接种时的轮虫密度

轮虫携卵率=(轮虫卵的个数/轮虫的个数)×100%

## 2 实验结果

### 2.1 温度对轮虫增殖的影响

温度在20~28℃范围内，轮虫的增殖倍率随水温升高而增大。温度为20℃时，轮虫的增殖倍率为1.09，温度为28℃时，轮虫的增殖倍率达到最大为4.5。当温度高于30℃时，轮虫的增殖倍率随水温升高而下降。

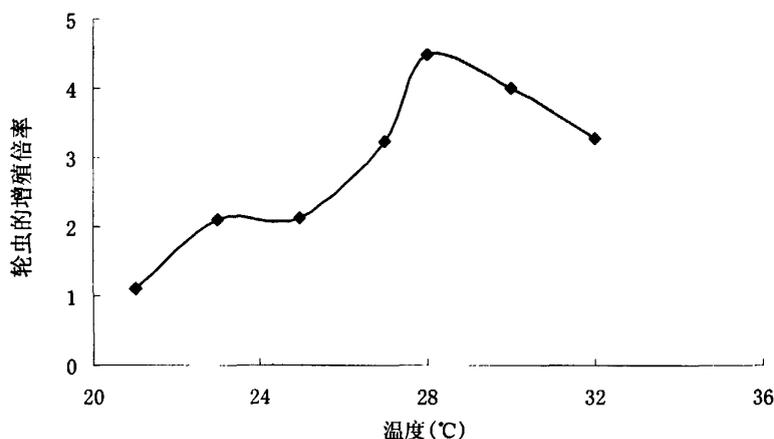


图10 温度对轮虫增殖倍率的影响

Fig.10 Effect of temperature on growth rate of rotifer

### 2.2 pH 值对轮虫增殖的影响

经过48h的培养后，各处理组的轮虫种群密度如图11。pH值为7.5时，轮虫增殖的密度达到最高，为123ind/mL，随着pH的升高或降低轮虫增殖的速度都有所下降，当pH值为3.5时，轮虫的密度由25降到7ind/mL，pH值高于10.5后，轮虫种群的增长速度下降，所以轮虫对pH值的耐受范围是4.5-11.5。

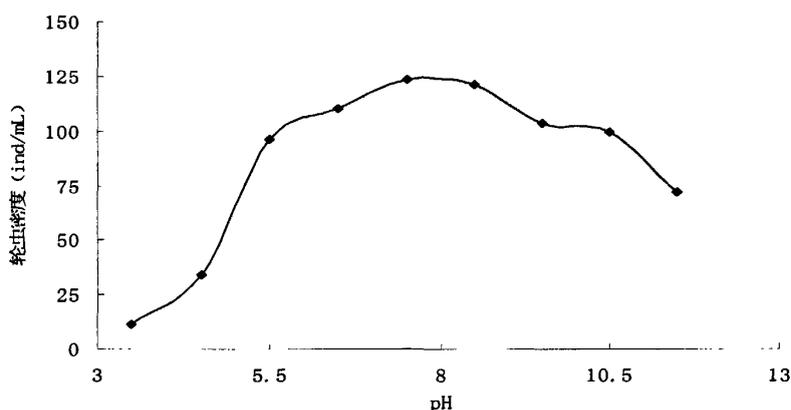


图11 pH对轮虫生长密度的影响  
Fig.11 Effect of Ph on growth of rotifer

### 2.3 携卵率对轮虫增殖倍率的影响

在轮虫的培养中，接种轮虫带卵率的多少，也是高效培养轮虫的关键之一。接种携卵率为410%的情况下，在培养48h后，轮虫的增殖倍率就可达到5.66，而接种携卵率为120%的情况下，增殖倍率为2.58。培养效率低于前者。轮虫的携卵率越高其增殖倍率越大。

表3 携卵率对轮虫增殖率的影响  
Table3 Effect of egg number on increase of rotifer density

组别	培养时间/h	轮虫(卵)密度ind/mL	携卵率%	增殖倍率
1	48	10(41)	410	5.66
2	48	10(32)	320	3.10
3	48	10(15)	150	2.03
4	48	10(12)	120	2.58

## 3 讨论

要实现轮虫的高效培养，培养水温应保持在25℃~29℃，考虑到节约能耗，水温保持在25~26℃比较适宜，小球藻在25℃~29℃生长情况较好，微藻的良好生长，不仅丰富了轮虫的饵料，并且微藻的光合作用，也改善了水质中的含氧量。

接种时轮虫的携卵率应在100%以上，使其不经过延滞期而直接进入对数生长期，

从而获得高的培养效率。在温度适宜，饵料充足的情况下轮虫进行孤雌生殖，孤雌生殖的特点是生殖量大，生殖率高，种群发展迅速。

pH是影响轮虫高效培养的又一个比较重要的环境因子。本实验结果表明当pH为7.5时，轮虫增殖率最大，过高或过低都会影响其产量；轮虫存活的pH范围为4.5~11.5，在轮虫的高效培养过程中，随着培养密度的加大，会出现水体中耗氧量下降及氨氮、亚硝态氮浓度上升，引起pH值变化，通常采取连续充气及利用加臭氧及生物过滤等水处理措施，调节水质。

## 第五章 混合饵料对轮虫种群密度的影响

饵料种类和浓度在轮虫培养中起着重要作用, 轮虫对不同藻类的摄食效果差别主要在于颗粒大小、营养质量、以及藻类本身活动能力等<sup>[49]</sup>。目前, 有关不同饵料对轮虫生长繁殖的影响方面文献较多, 主要集中在单一藻类对轮虫繁殖影响的研究, 有关混合藻类饵料对轮虫影响的研究报道较少, 但混合藻类饵料的开发是提高轮虫营养质量的重要内容。为此, 本文在分析聚球藻、水华鱼腥藻和衣藻等3种藻类的适宜投放浓度基础上, 探索在相同体积的培养水体中这3种藻类以不同比例混合后对轮虫种群动态的影响, 并比较其饵料效果, 为淡水轮虫规模化培育提供基础数据和参考。

### 1 实验材料

衣藻 (*Chlamydomonas sp.*)、水华鱼腥藻 (*Anabaena flos-aquae*) 由鲁东大学经济藻种库提供。转金属硫蛋白基因聚球藻 (*Synechococcus sp.*) 由北京大学茹炳根教授提供。

壶状臂尾轮虫 (*Brachionus urceus*) 采自池塘, 经分离纯化后培养。

### 2 实验方法

四种藻采用自然光照(白天光照为 1000—10000lx, 夜间光照小于 1lx)温度为 20-24℃的条件培养。实验时将藻液用 300 目的筛绢过滤, 以去除藻液中的絮凝。在 560nm 波长下测定 OD 值, 由标准曲线得出相应的密度。三种微藻按不同的质量比进行混合, 如表 3。

分别取不同混合比例的微藻液各 5L, 加入 20mL 轮虫预养液, 接种轮虫密度为 25 ind/mL。置于光照培养箱 (25~28℃), 光照度 200~250lx, 光照时间 L:D = 12:12, 每隔 24h 对轮虫进行计数, 每个处理重复 3 次。

表 4 微藻的混合比例 (干重)

Table4 the proportion of the mixing algae (dry weight)

组编号	种类	比例
1.	鱼腥藻: 衣藻: 聚球藻	1: 1: 1
2.	鱼腥藻: 衣藻: 聚球藻	2: 1: 1
3.	鱼腥藻: 衣藻: 聚球藻	1: 2: 1
4.	鱼腥藻: 衣藻: 聚球藻	1: 1: 2
5.	鱼腥藻: 衣藻: 聚球藻	3: 1: 1
6.	鱼腥藻: 衣藻: 聚球藻	1: 3: 1
7.	鱼腥藻: 衣藻: 聚球藻	1: 1: 3
8.	鱼腥藻: 衣藻: 聚球藻	5: 1: 1
9.	鱼腥藻: 衣藻: 聚球藻	1: 5: 1
10.	鱼腥藻: 衣藻: 聚球藻	1: 1: 5

数据分析:数据处理通过统计软件SPSS11.5进行单因素方差分析(One Way ANOVA)

### 3 实验结果

#### 3.1 不同质量比的混合饵料, 对轮虫种群密度的影响

由图 12 可见, 3 种单细胞微藻, 按 1: 1: 1 的质量比混合, 投喂轮虫后, 培养至 96h 时, 轮虫种群密度达到高峰, 为 910ind/mL, 96h 后之后轮虫密度开始下降。

由图 13 可见, 3 种单细胞微藻按 2:1:1, 1:2:1, 1:1:2 的质量配比混合, 投喂轮虫, 在 96h 时, 组 2 (2:1:1) 的轮虫密度最大峰值为 780ind/mL。组 3(1:2:1)、组 4(1:1:2) 的种群密度最大值分别为 600 ind/mL、540 ind/mL。组 2 的投喂效果明显优于组 3、组 4, 方差分析表明, 该实验组各处理的轮虫种群密度差异显著 ( $p < 0.05$ )。

由图 14 可见, 3 种单细胞微藻按 3:1:1, 1:3:1, 1:1:3 的质量配比混合, 组 6 (1:3:1) 在 96h 时, 轮虫种群密度达到的最高值为 880 ind/mL, 组 5 (3:1:1) 在 120h 达到最高值 832 ind/mL, 组 7 (1:1:3) 在 96h 达到最高值为 790 ind/mL。该实验组各处理的轮虫种群密度差异不显著 ( $p > 0.05$ )

由图 15 可见, 3 种单细胞微藻按 5:1:1, 1:5:1, 1:1:5 的质量配比混合在 96h 时, 轮虫种群密度达到的峰值的 940ind/mL, 组 9 (1:5:1)、组 10 (1:1:5) 的种群密度最大值分别为 780 ind/mL、750 ind/mL。组 8 (5:1:1) 与其他两组的种群密度差异显著 ( $p < 0.05$ ), 组 9, 组 10 对轮虫的投喂效果无显著影响 ( $p > 0.05$ )

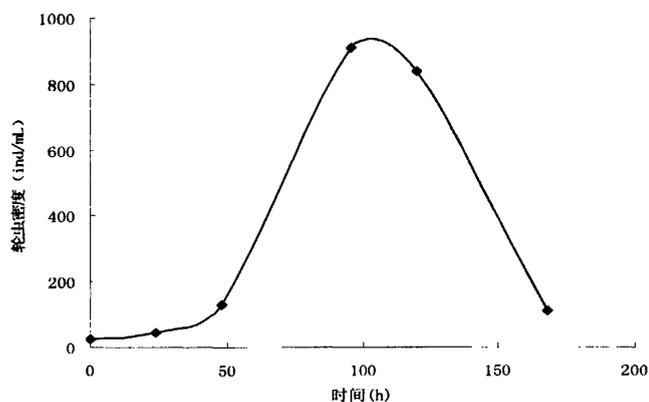


图12 3 种藻类按1:1:1配比后轮虫种群密度变动曲线

Fig. 12 Growth curve of rotifer feeding by mixture of 3 species of algae with proportion of 1:1:1

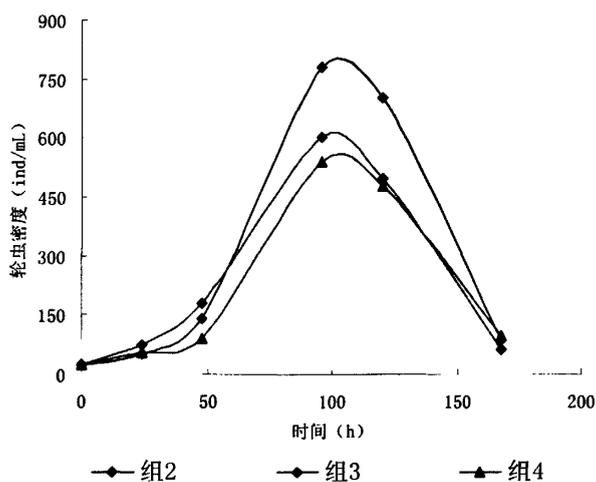


图13 3 种藻类按2:1:1, 1:2:1, 1:1:2配比后轮虫种群密度变动曲线

Fig. 13 Growth curve of rotifer feeding by mixture of 3 species of algae with proportion of with proportions of 2:1:1,1:2:1,1:1:2

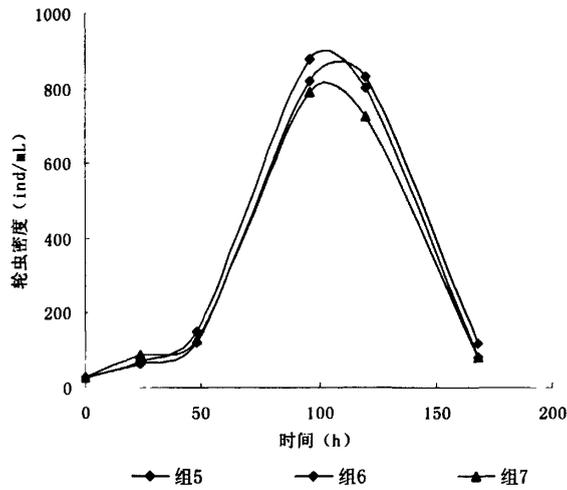


图14 3 种藻类按3:1:1, 1:3:1, 1:1:3配比后轮虫种群密度变动曲线  
Fig. 14 Growth curve of rotifer feeding by mixture of 3 species of algae with proportion of with proportions of 3:1:1,1:3:1,1:1:3

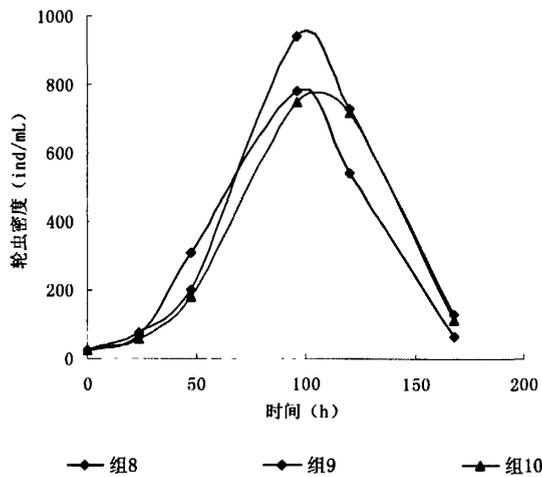


图15 3 种藻类按5:1:1, 1:5:1, 1:1:5配比后轮虫种群密度变动曲线  
Fig. 15 Growth curve of rotifer feeding by mixture of 3 species of algae with proportion of with proportions of 5:1:1,1:5:1,1:1:5

### 3.2 不同倍数处理组的最佳效果对比

轮虫的增殖效果依次是组 8、组 1、组 6、组 2，可见组 1、组 6、组 8 的投喂

效果没有显著差异 ( $p>0.05$ ), 组2 效果最差, 对轮虫种群有显著影响 ( $p<0.05$ )

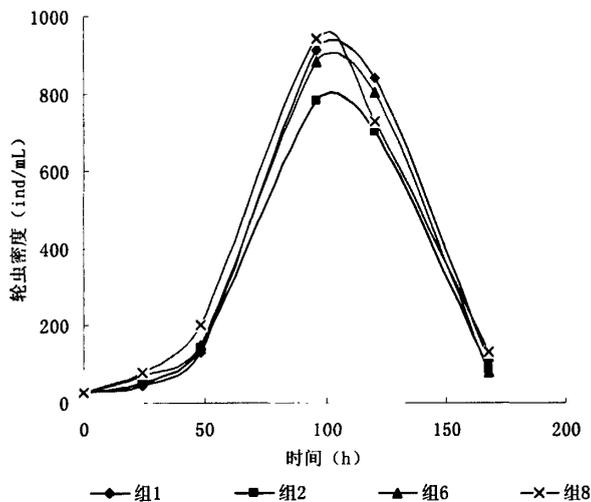


图16 不同质量比对轮虫种群密度影响的比较  
Fig. 16 The optimal proportion of algae for growth of rotifer

### 3.3 不同倍数处理组的最差效果对比

每个处理组中最差效果对比显示, 混合比例为 1 倍时最佳, 2 倍组最差, 3 倍、5 倍无显著差异 ( $p>0.05$ )。

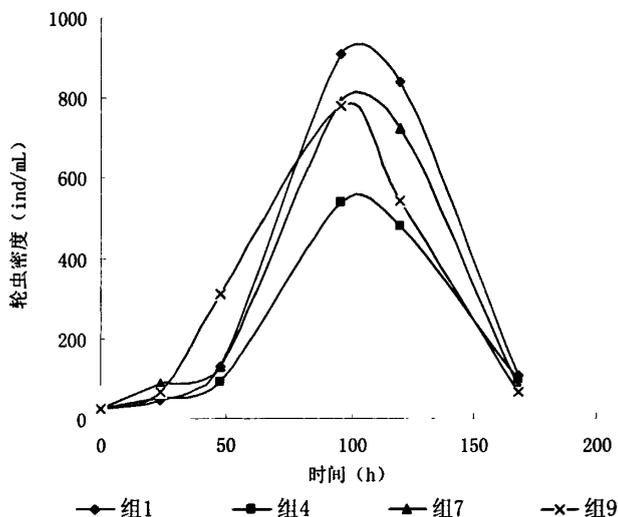


图17 不同质量倍数配比后轮虫种群密度变动曲线的最差效果对比  
Fig. 17 The worse variation curve of population density of rotifer *B. urceus* feeding on different mixture of 3 algae

### 3.4 各处理组对轮虫密度的影响对比

从各组的对比来看,组8的饵料效果最佳,再它依次为组1,组6,组5,组7,组9,组2,组10,组3,组4,但组5的轮虫生长速率最低。组8的轮虫密度最高为940ind/mL,组4的投喂效果最差540ind/mL。

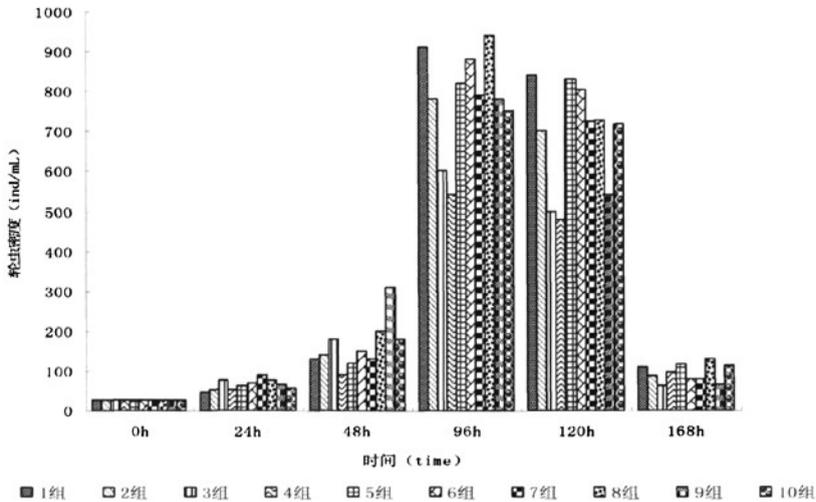


图18 不同质量倍数配比后轮虫种群密度变动曲线的

Fig. 18 Variation curve of population density of rotifer *B. urceus* feeding on different mixture of 3 algae

## 4 讨论

水华鱼腥藻 (*Anabaena flosaquas*) 属于蓝藻门, 植物体为单一丝状体, 其粗蛋白和粗脂肪分别占干重的 61.8%, 12.9%[50]。由于其蛋白含量丰富, 所以常用于提取藻蓝蛋白, 而且在单一饵料的投喂过程中, 发现它的饵料效果很好。衣藻 (*Chlamydomonas*) 属于绿藻门, 球形或卵形, 能游动, 其粗蛋白和粗脂肪分别占干重的 52.1%, 9.5%, 易培养, 其细胞有鞭毛, 能游动, 在水体中分布均匀[51], 实验中发现, 在黑暗条件下, 衣藻的饵料效果最好, 它的无光系统 I 发挥作用使其均匀放 O<sub>2</sub>, 有利于轮虫在黑暗环境下的生长繁殖。聚球藻 (*Synechococcus* sp) 属于蓝藻门, 细胞圆柱形或长圆形, 直或略弯曲, 两端钝圆, 细胞直径约为 1.6 μm, 单细胞或 2-3 个细胞相连而成短丝体。

其粗蛋白约占干重的 45%以上，粗脂肪约占干重的 2.7%[52]，其细胞个体较小，适宜做为小个体轮虫的开口饵料。

相同培养条件下，单一饵料种类轮虫达到高密度的时间一般为 168h，种群密度最高为 450 ind/mL，混合饵料培养时轮虫达到最高密度的时间一般为 96h，达到的最大种群密度为 940ind/mL，时间减少近一半，而种群密度增加近一倍。混合饵料的投喂效果明显优于单一饵料，提高了轮虫的密度，缩短了达到最大密度的时间，提高了轮虫的繁殖速率。各处理中轮虫密度达到最高的是组 8（即鱼腥藻：衣藻：聚球藻为 5：1：1），其他依次是鱼腥藻：衣藻：聚球藻为 1：1：1、鱼腥藻：衣藻：聚球藻 1：3：1、鱼腥藻：衣藻：聚球藻 3：1：1、鱼腥藻：衣藻：聚球藻 1：1：3、鱼腥藻：衣藻：聚球藻 1：5：1、鱼腥藻：衣藻：聚球藻 2：1：1、鱼腥藻：衣藻：聚球藻 1：1：5、鱼腥藻：衣藻：聚球藻 1：2：1、鱼腥藻：衣藻：聚球藻 1：1：2。但从最佳效果和最差效果的对比中发现，当混合比例为 2 倍时，轮虫的种群密度增长最差，当鱼腥藻：衣藻：聚球藻为 1：1：1 时，轮虫的密度达到 910ind/mL，较适宜作为轮虫的饵料。混合饵料的优点是适口性好、诱食性强，弥补单一饵料营养不足成分不均衡，而且混合饵料的组成更适合于不同大小轮虫的摄食，有大范围推广的实用价值，可以提高饵料的利用效率。

## 第六章 不同饵料对轮虫体内营养组分含量的影响

### 1 材料

壶状臂尾轮虫(*Brachionus urceus*): 从不同处理组的轮虫培养体系中采收一定量的轮虫, 用蒸馏水冲洗 3 遍。

### 2 方法

#### 2.1 粗蛋白的测定

##### 2.1.1 仪器

UV-2000 型紫外可见分光光度计, 尤尼柯(上海)仪器有限公司;

FC204 型分析天平, 上海精科天平厂;

TGL-16C 台式离心机, 上海安亭科学仪器厂;

##### 2.1.2 试剂

考马斯亮蓝 G-250 试剂: 用分析天平准确称取 100mg 考马斯亮蓝 G-250 溶于 50ml 的 95%乙醇中, 加入 100ml85%的磷酸, 再用蒸馏水定容到 1L, 贮于棕色瓶中<sup>[42]</sup>。

100  $\mu$ g/ml 标准蛋白溶液: 用分析天平准确称取 10mg 牛血清白蛋白, 溶于蒸馏水, 并定容至 100ml, 制成 100  $\mu$ g/ml 的标准蛋白溶液。

##### 2.1.3 测定方法<sup>[53]</sup>

称取不同处理组的轮虫各 0.02g, 加入少量水、石英砂, 在冰浴中研磨半小时, 经-18℃反复冻融三次, 定容至 25mL, 4℃冷藏<sup>[54]</sup>。取上清液 1 mL, 稀释 10 倍待测。向待测液中加入 5mL 考马斯亮蓝 G-250 试剂, 混匀, 放置 2 分钟后用 UV-2000 型紫外可见光光度计测定 595nm 的吸光度(OD)。根据测定的 OD<sub>595</sub> 值和蛋白质浓度标准曲线, 计算提取液中蛋白质浓度, 再结合样品重量, 计算样品中蛋白质含量(%)。

#### 2.2 氨基酸的测定

用电子秤称取 20—25mg 样品, 装入离心管中(可密封, 抽真空), 加入 20mL6mol/L 的 HCl, 抽真空后, 封管, 于 110℃烘箱中水解 20-24h。开管、过滤, 其滤液以 Hiltachi 835

—50 型氨基酸分析仪测定各种氨基酸的含量<sup>[55,56]</sup>。

## 2.3 不饱和脂肪酸的测定

### 2.3.1 仪器

HP6890A 气相色谱仪 (日本岛津 GC-14C)  
FC204 型分析天平(上海精科天平厂)  
TGL-16C 台式离心机(上海安亭科学仪器厂)

### 2.3.2 标准曲线制备

称取各脂肪酸甲酯标准品适量, 分别用无水甲醇配制成 2000ug/ml 的标准贮备液。测样品时分别移取各贮备液 1、2、4ml 置于 10ml 容量瓶, 用无水甲醇稀释定容, 配制成 200、400、800ug/ml 的混合标准系列, 各取 2ul 注入气相色谱仪, 进行两次平行测定, 以保留时间定性, 峰面积定量, 以峰面积对应脂肪酸浓度 (ug/ml) 绘制标准曲线。

### 2.3.3 测定方法

分别将组8、组6、组1的轮虫采收, 用蒸馏水冲洗干净, 吸干虫体表面水分, 55 °C 鼓风干燥后磨碎, 用于脂肪酸测定, 每样品设3 个平行<sup>[57]</sup>。称取50 mg样品, 加入氯仿—甲醇-水 (1: 2: 0.8) 的混合液5 mL, 在4°C 黑暗条件下混合30min, 离心, 取上清液, 重复3-4次, 直到上清液澄清。调节上清液的氯仿—甲醇-水的比例为1: 1: 0.9, 再离心分层, 取下层。转移到小瓶中, 为总脂肪的含量。提取的总脂肪用KOH -甲醇的饱和溶液进行皂化, 用1N盐酸调pH为2进行酸化, 用2%的硫酸-甲醇溶液进行甲酯化, 静置30 min, 用正己烷萃取3次, 用真空旋转蒸发器蒸干, 再加适量的正己烷定容到2 μ L, 用 HP6890A气相色谱仪分析, 分离柱采用交联SIL 88(20m×0.25mmID×0.2mmDF)毛细管色谱柱, 载气:N<sub>2</sub>, 线速度20cm/min, 分流进样, 分流比:1:40, 汽化室温度:220°C, 柱室温度:80°C, 保持2 min, 以5°C/min升温至240°C, 检测器:FID, 280°C, C-R4A色谱专用数据处理机进行数据处理。采用外标法定量。EPA、DPA和DHA甲酯的线性回归方程相关系数>0.999, 重复性试验:SD<3%<sup>[58]</sup>。

## 3 实验结果

### 3.1 各处理组轮虫的粗蛋白的含量

在各处理中, 组 8 的轮虫 (即鱼腥藻: 衣藻: 聚球藻为 5: 1: 1) 的蛋白含量最高,

达到 65.38%，含量最低的是组 4（即鱼腥藻：衣藻：聚球藻为 1：1：2），其他依次是组 5、组 2、组 9、组 1、组 10、组 6、组 3、组 7，可见含量较高的前三组，都是鱼腥藻的质量比例较大的情况，所以混合饵料中鱼腥藻的比例越高，所投喂的轮虫体内蛋白含量越高。

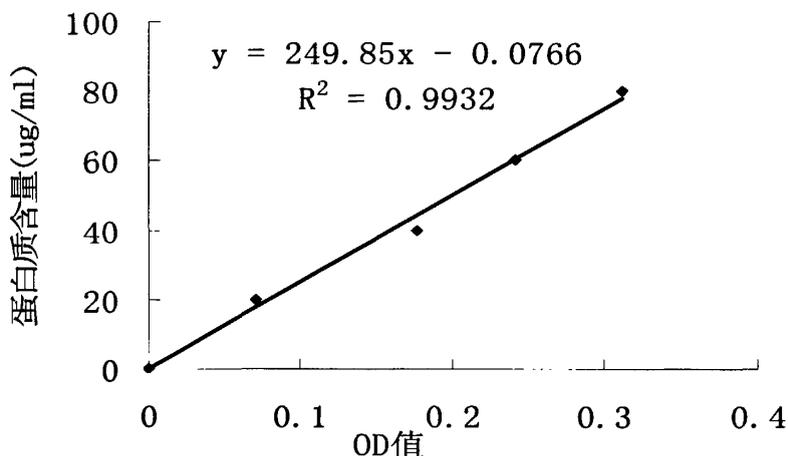


图 19 OD 与牛血清白蛋白含量的标准曲线

Fig. 19 Standard curve of OD and the content of protein

表 5 各处理组轮虫的粗蛋白含量

Table5 Contents of protein of the different groups

编号	OD 值	蛋白含量 %
1	0.232	57.889
2	0.247	61.636
3	0.225	56.140
4	0.220	54.890
5	0.251	62.636
6	0.229	57.139
7	0.223	55.640
8	0.262	65.384
9	0.234	58.390
10	0.229	57.140

### 3.2 组 8 轮虫的 3 种氨基酸含量的含量

经检测发现该实验组的氨基酸组成中天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸的含量最高分别为 6.206%、4.107%、3.214%。

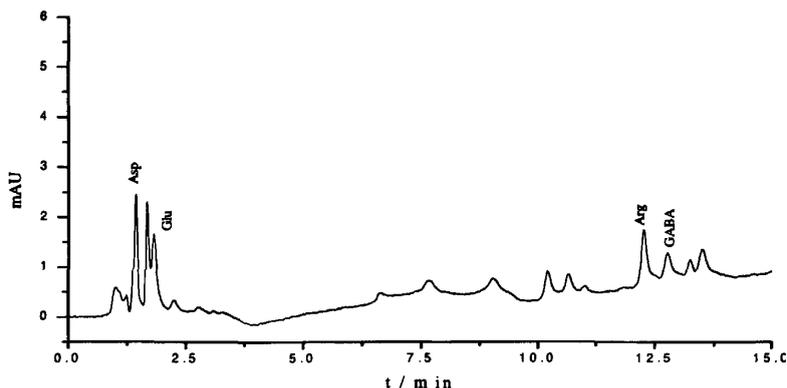


图 20 氨基酸的液相色谱

Fig.20 Liquid chromatography of Amino acids of Group8

表 6 组 8 的 3 种氨基酸的含量

Table6 The content of Amino acids of Group8

氨基酸的种类	含量 %
Asp	6.206
Glu	4.107
Arg	3.214

### 3.3 组 8、6、1 不饱和脂肪酸的含量

通过检测，组 8，组 1，组 6 中，EPA 的含量分别为 0.7369%，0.3721%，0.5636%，组 8 中的含量最高，其它依次是组 6、组 1；DHA 在 3 组中含量分别为 0.5386%，2.8913%，0.5771%，组 1 中的含量最高，其它依次是组 8、组 6。（由于实验方法和仪器的限制，本次试验所测的 EPA 和 DHA 含量只能做为轮虫体内含量高低的对比，不作为它们在轮虫体内的绝对含量）

表 7 不同混合比例的饵料投喂后轮虫体内 EPA 和 DHA 的含量

Table7 The content of EPA and DHA in rotifers feeding by different proportion of algae 脂肪酸 摄食不同混合比例的饵料的轮虫体内的脂肪酸含量%

	组 8	组 1	组 6
EPA	0.7369	0.3721	0.5636
DHA	0.5386	2.8913	0.5771

## 4 讨论

投喂的混合饵料中，鱼腥藻的比例越大，轮虫体内蛋白含量越高，本实验的最高含量为组 8，其粗蛋白含量达 65.38%，通过对该组 3 种氨基酸含量的测定，天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸含量分别为 6.206%、4.107%、3.214%。精氨酸是一种条件必需氨基酸，在体内参与能量代谢中的三羧酸循环及具有解毒作用的尿素循环，促使机体能量平衡，促进有毒物质排出体外，因此它常被用来解除肾脏毒素。精氨酸已确认具有增强肌肉的作用。用大鼠做实验，让其进行轻微的小跑运动，在摄入精氨酸后，腿肚肌肉（和腹部肌肉）增加。没有摄取氨基酸时效果较差。当运动与摄入氨基酸同时进行，具有明显的效果。在人和动物营养中，精氨酸的免疫作用对人的健康和动物的生长是不可忽视的。尤其是近些年精氨酸在育苗中应用，提高幼苗的免疫力，减少抗生素的应用。

酵母饲喂的轮虫体内所含的 n -3PUFA(多聚不饱和脂肪酸) 不能满足苗种生长的需要，而微藻中所含有的 n -3PUFA 经轮虫传递到苗种体内，满足了苗种的需求<sup>[59-63]</sup>。有研究表明，轮虫可以通过摄入或者自身合成饱和脂肪酸(SFA) 和单不饱和脂肪酸(MUFA)，以调节体内两者的组成比例，但是对于长链高度不饱和脂肪酸(PUFA) 却缺乏合成机制<sup>[54]</sup>。而 n -3PUFA 对苗种具有重要的生物学意义，其中的二十碳五烯酸(EPA) 和二十二碳六烯酸(DHA) 对初孵仔鱼的生长、存活甚为重要<sup>[64]</sup>。为了提高饵料的综合性能，保持轮虫的高密度生长，取轮虫增殖效果较好的前三组（组 8，组 1，组 6）进行脂肪酸分析，主要以 DHA 和 EPA 的含量为指标。DHA 和 EPA 对细胞膜正常生理功能的维持、神经发育及繁殖率、受精率和孵化率都有重要的影响，并且影响苗种色素的正常沉着和激素的合成<sup>[65-67]</sup>。结果表明，EPA 在组 8 中的含量最高，其它依次是组 6、组 1，DHA 在组 1 中的含量远高于其他两组。

## 结论

在自然条件下每只轮虫对小球藻的日平均摄食量为 34000—63000 个，每只轮虫对聚球藻的日平均摄食量为 47500—69600 个。在黑暗条件下每只轮虫对小球藻的日平均摄食量为 92000—140000 个，每只轮虫对聚球藻的日平均摄食量为 117000—128000 个。轮虫的摄食量跟微藻的浓度有关，微藻饵料的浓度不同，轮虫的摄食量也不同，且轮虫的摄食量与微藻的浓度也不是正相关关系。

轮虫的摄食跟微藻的种类有关，6d 的时间里，自然条件下，轮虫可以将小球藻、聚球藻、衣藻、鱼腥藻的密度分别减少 0.173 g/L、0.875 g/L、0.262 g/L、0.453 g/L。黑暗条件下轮虫可将小球藻、聚球藻、衣藻密度分别减少 0.169 g/L、0.446 g/L、0.277 g/L，鱼腥藻的密度减少不明确。实验结果显示，自然条件下，对照组第 5d 衣藻和鱼腥藻进入指数生长期，但是加入轮虫的实验组在相同的时间里，各微藻的生长受到严重的抑制，水质渐变澄清，瓶底形成土黄色的絮凝沉淀物，由于食物的缺乏，轮虫的密度也开始下降，当加入微藻，轮虫的密度又开始回升，微藻数量迅速降低，所以轮虫能有效的降低水体中微藻的含量，维持生态系统的平衡，降低富营养化造成的污染。

不同微藻对轮虫增殖效果的影响不同，光照条件下，摄食小球藻，聚球藻，衣藻，鱼腥藻的轮虫，最高密度分别为 450 个/mL、52 个/mL、280 个/mL、430 个/mL。投喂小球藻组，轮虫的生长速率最高，其次是鱼腥藻组，聚球藻最差。黑暗条件下，摄食小球藻的轮虫，最大密度为 110 个/mL；摄食聚球藻的轮虫，密度由 25 个/mL 降到 0 个/mL；摄食衣藻的轮虫，最高密度为 120 个/mL。摄食鱼腥藻的轮虫，密度有降无升。黑暗条件下，由于衣藻的游动性，使衣藻的投喂效果最好。

要实现轮虫的高效培养，培养水温应保持在 25℃~29℃，考虑到节约能耗，水温保持在 25~26℃比较适宜。接种时轮虫的携卵率应在 100%以上，使其不经过延滞期而直接进入对数生长期，从而获得高的培养效率。pH 也是影响轮虫高效培养的一个重要的环境因子。本实验结果表明当 pH 为 7.5 时，轮虫增殖率最大，过高或过低都会影响其产量，轮虫存活的 pH 范围为 4.5~11.5。

相同培养条件下，单一种类达到高峰的时间一般都为 168h，种群密度最高为 450 ind/mL，混合饵料达到峰值的时间一般为 96h，达到的最大种群密度为 940ind/mL，时间减少近一半，而种群密度增加近一倍。混合饵料的投喂效果明显优于单一饵料，提高了轮虫的密度，缩短了达到最大密度的时间，增加了轮虫的繁殖速率。鱼腥藻：衣藻：

聚球藻为 5: 1: 1 时, 轮虫在 96h 达到最大密度, 为 940ind/mL。

轮虫的营养成分分析得出: 投喂的混合饵料中, 鱼腥藻的比例越大, 轮虫体内蛋白含量越高, 当投喂的鱼腥藻: 衣藻: 聚球藻为 5: 1: 1 时, 轮虫体内粗蛋白含量最高, 达 65.38%。对该组轮虫体内的氨基酸含量的测定得知, 天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸含量分别为 6.206%、4.107%、3.214%。取轮虫增殖效果较好的前三组(组 8, 组 1, 组 6)进行脂肪酸分析, 主要以 DHA 和 EPA 的含量为指标。结果表明, EPA 在组 8 中的含量最高, 其它依次是组 6、组 1; DHA 在组 1 中的含量最高, 其它依次是组 8、组 6。

混合饵料的优点是适口性好、诱食性强、营养丰富全面, 弥补单一饵料营养成分不足, 而且混合饵料的组成更适合于不同大小轮虫的摄食, 有大范围推广的实用价值, 提高饵料的利用效率和营养价值等综合性能。所以在育苗的过程中, 根据不同时期, 幼苗的不同营养需求, 选择不同的混合饵料, 充分发挥生物饵料在育苗中的优势。

参考文献

- [1] 马云聪, 李全振. 加快发展轮虫养殖[J]. 河北渔业, 2006, 06(06): 42-49
- [2] 丁建平. 添加维生素B12 生产菌高密度培养褶皱臂尾轮虫的效果[J]. 青岛海洋大学学报. 1994, 24(4): 167-174
- [3] 李师翁. 小球藻大规模培养研究的进展[J]. 植物学通报. 1998, 4(04) 32-37
- [4] 陈云波, 禹爱民. 盐度对褶皱臂尾轮虫存活及其休眠卵孵化的影响[J]. 水产科学. 1997, 16(5): 12-19
- [5] 王金秋. PH 值对萼花臂尾轮虫种群增长及繁殖的影响[J]. 应用生态. 1997, 8(4): 435-438
- [6] 胡守义. 轮虫的饵料意义及人工培养[J]. 水科科学. 1997, 16(2): 24~26
- [7] 王家辑. 中国淡水轮虫志[M]. 北京: 科学出版社. 1961. 288
- [8] 李永函. 养鱼池轮虫休眠卵分布和萌发的研究[J]. 水生生物学报. 1985, 9(1): 20~30
- [9] 黄祥飞. 温度对萼花臂尾轮虫卵的发育种群增长及生产量的影响[J]. 水生生物学报. 1985, 9(3): 32~39
- [10] 杨家新, 黄祥飞. 温度和密度对萼花臂尾轮虫产卵量和混交雌体形成的影响[J]. 湖泊科学. 1996, 8(4): 367~372
- [11] 席貽龙, 黄祥飞. 轮虫休眠卵形成和萌发的生态机理研究进展[J]. 水生生物学报. 1999, 23(1): 73~82
- [12] 刘建康. 高级水生生物学[M]. 北京: 科学出版社. 1999, 312
- [13] Akinori Hino. Shigeru aoki . Masakazu Ushiro. Nitrogen - flow in the rotifer *Brachionus rotundiformis* and its significance in masscultures[J]. *Hydrobiologia* ,1997,358(13):77~82
- [14] Birky C W J r. Parthenogenesis in rotifer : the control of sexual and asexual reproduction[J]. *Amer Zool*,1971,11(06):245~266
- [15] Chen F , Johns M R. A Strategy for high cell density culture of heterotrophic microalgae with inhibitory substrates [J]. *J Appl phycol*,1995,(7):43~46
- [16] 陈明耀. 生物饵料培养[M]. 中国农业出版社, 1998, 94~110.
- [17] 田景波、孙广德、张庆文、宋德敬. 不同饵料对褶皱臂尾轮虫种群生长繁殖的影响. 中国水产科学. 1982, 12(5) 4: 37~41
- [18] 黄祥飞. 简易测重法在武汉东湖轮虫常见种中的应用[J]. 水生生物学集. 1981, (3): 409—416

- [19] Sladeck V. Rotifera as indicators of water quality [J]. *Hydrobiology*, 1983, 100(4): 169—201.
- [20] 陈学豪, 吴钟强. 小球藻营养液投喂轮虫效果研究 [J]. *福建农业学报*. 2005, (20) : 63—67
- [21] 王家楫. 中国淡水轮虫志 [M]. 北京科学出版社, 1961: 1—50
- [22] 王金秋. 淡水轮虫批量培养的研究进展 [J]. *水产科技情报*, 1987, 15 (1) : 42~50.
- [23] 陈明耀. 生物饵料培养 [M]. 北京中国农业出版社, 1995: 104—10.
- [24] 王金秋, 李德尚, 曹吉祥. 五种淡水浮游藻对萼花臂尾轮虫的饵料效果的比较研究——藻的最适投喂密度及轮虫相应的种群增长 [J]. *海洋与湖沼*, 1998, 29(01) : 15—21.
- [25] 孙东红, 邹宁, 赵红庆. 褶皱臂尾轮虫的培养研究 [J]. *中国水产*, 2005, 12(04) : 71—73
- [26] Edmondson, Edmondson W.T, Reproductive rates of rotifers in natural populations [J]. *Memorie dell* 1960, 12(07) 21—77.
- [27] 谢宗平. 轮虫与水环境保护 [J]. *张掖师专学报 (综合版)*. 1997, 14(01) : 76—79
- [28] 谢钦铭, 李云, 李长春. 鄱阳湖轮虫种类组成与现存量季节变动的初步研究 [J]. *江西科学*, 1997, (4) : 235—241.
- [29] 饶小珍, 许友勤, 陈寅出. 福州内河的轮虫与水质评价 [J]. *福建师范大学学报 (自然科学版)*, 2000, (1) : 71—75.
- [30] 黄祥飞. 简易测重法在武汉东湖轮虫常见种中的应用 [J]. *水生生物学集刊*, 1981, (3) : 409—416.
- [31] 沈银武, 黄泽波, 朱运芝等. 鱼腥藻 (*Anabaena* sp.) 营养成分分析 [J]. *武汉植物学研究*, 1994, 12(1) : 61~64.
- [32] Corner E D S, Cowey C B. Biochemical studies on the production of marine zooplankton [J]. *Biol Res*, 1968, 43: 393—426
- [33] Cheng Y X, Wang W, Wu J M, et al. Effect of dietary lipid sources on fatty acid composition of rotifer *Brachionus plicatilis* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2001, 8(4) : 52—57
- [34] Oltra R, Todoli R, Bosque T, et al. Life history and fatty acid composition of the marine rotifer *Synchaeta cecilia valentina* fed differential algae [J]. *Marine Ecology progress series*, 2000, 193 : 125—133
- [35] 章宗涉, 黄祥飞. 淡水浮游生物研究方法. 北京: 科学出版社, 1991, 342—344
- [37] 黎尚豪, 朱惠. 单细胞藻类的大量培养试验 [J]. *水生生物学集刊*, 1959, 4: 463—463

- [38] Guillard R R L, Lorenzen C J. Yellow2green algae with chlorophyllide [J] .C J Phycol , 1972 ,8 :10—14
- [39] 李树国. 饵料生物对轮虫培养效果的研究. 内蒙古民族大学学报(自然科学版), 2001, 16(3):281~283.
- [40] 孙迪杰, 刘娟然. 温度对褶皱臂尾轮虫寿命和繁殖的影响[J]. 水产科学, 1993, 12(6) 14~17.
- [41] 游岚, 陈品健, 唐晓刚. 褶皱臂尾轮虫大面积培养技术[J]. 海洋科学, 1994, 5:4~6
- [3] 李元广, 许璞, 魏万权等轮虫培养过程中生长及环境变化特征分析[J]. 水产养殖, 2000, 3:23~26.
- [42] 胡正芝, 刘仪, 尹宗伦译. 食品中营养素的分析[M]. 北京:科学出版社, 1987, 150
- [43] 王渊源. 鱼虾营养概论[M]. 厦门:厦门大学出版社, 1993 , 21
- [44] 王金秋. 影响萼花臂尾轮虫种群增长的生态学因子的研究——温度和饵料密度的影响[J]. 海洋湖沼通报, 1995, (4) :21~27.
- [45] 沈银武. 六种鱼腥藻在大量培养中的生产率和适应性及营养成分的比较[J]. 水生生物学报, 1992, 16(3) :267~273.
- [47] Lee. JW, 柳武德. 无需光系统I (PSI) 的放氧光合自养生长[J]. 农业科技译丛(杭州), 1997, 1:12-16
- [48] 姜悦, 陈峰, 梁世中. 利用海洋微藻生产 $\omega$ 23 多不饱和脂肪酸[J]. 海洋科学, 1997, (6) :18 —20
- [49] Lee. JW, 柳武德. 无需光系统I (PSI) 的放氧光合自养生长[J]. 农业科技译丛(杭州), 1997, 1:12-16
- [50] 曹春晖, 孙世春, 麦康森等. 30株海洋绿藻的总脂含量和脂肪酸组成[J]. 青岛海洋大学学报, 2000, 30(3) :428 —434
- [51] 李何芳, 周汉秋. 海洋微藻脂肪酸组成的比较研究. 海洋与湖沼, 1999, 30(1) :34 —39
- [52] Zhukova N V, Aizdaicher N A. Fatty acid composition of species marine microalgae[J] . Phytochemistry , 1995 , 39(2) :351 —356
- [53] Renaud S M, Parry D L , LuongVan Thinh , et al . Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of Isochrysis sp. and Nannochloropsis oculatafor use in aquaculture[J] . JPhycol , 1991 , 26 : 393 —399
- [54] Dunstan G A , Volkman J K, Barrett S M D , et al . Changes in the lipid composition and

maximization of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture [ J ] . J Appl Phycol , 1993 , 5 : 71 —83

[55]王大志, 彭兴跃, 程兆第等. 海水小球藻脂肪酸组成研究[J]. 海洋科学, 1999, (4) : 68—70

[56]梁英, 麦康森. 微藻EPA和DHA的研景[J]. 水产学报, 2000, 24(3) : 289 —296

[57]丛峰松主编. 生物化学实验[M]. 上海: 上海交通大学出版社, 2005. 6

[58]陈毓荃主编. 生物化学实验方法和技术[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 3

[59]杨嘉实, 李复兴, 关彦华. 氨基酸饲料学[J]. 北京: 农业出版社. 1989, 44 —47

[60]杨秀霞, 于浩, 曾晓起. 影响微藻脂肪酸组成因素概述. 海洋湖沼通报, 2001, (1) : 76—81

[61]林学政, 李光友. 11种微藻脂肪和EPA/DHA组成的研究[J]. 黄渤海海洋, 2000, 18(2) : 36—40

[59] Stemberger R A. General approach to the culture of planktonic rotifer [ J ] . Can J Fish Aquat Sci , 1981 , 38 : 721 —724

[62]沈银武, 刘永定, 朱运芝等. 利用鱼腥藻( *Anabaena* sp. ) 作为饲料的研究[J]. 水生生物学报, 1999, 23(5) : 425~433.

[63]Rainuzzo J R, Reitan K I, Olsen Y. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. [ J ] A quaculture, 1997, 155: 103~115

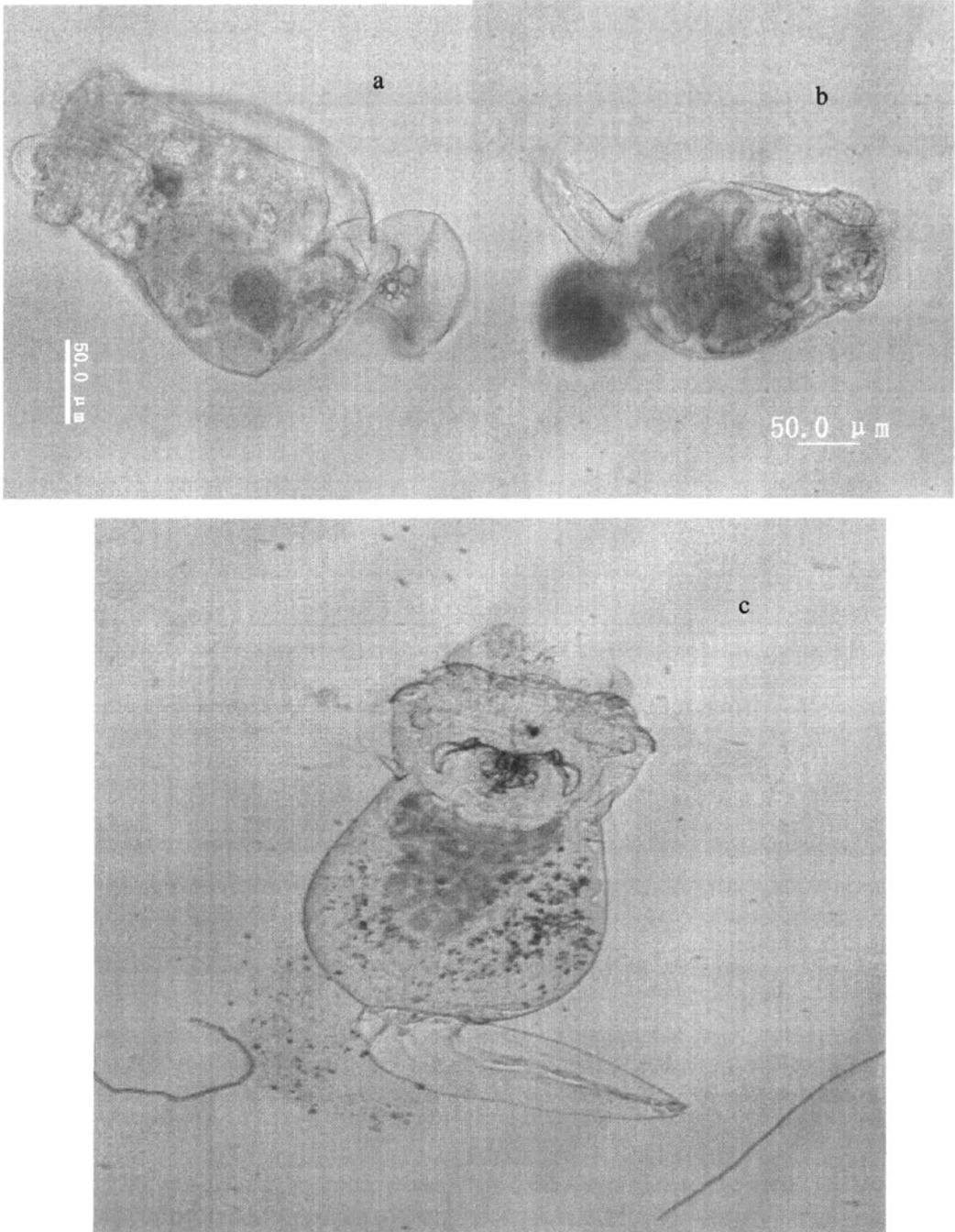
[64]Sargent J R, McEvoy L A , Bell J G. Requirement, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. [ J ] A quaculture, 1997, 155: 117~127

[65]Watanabe T. Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. [ J ] J World Aquacul Soc, 1993, 24: 152~161

[66]Rodriguez C, Perez J A , Izquierdo M S, et al. Improvement of the nutritional value of rotifers by varying the type and concentration of oil and the enrichment period. [ J ] A quaculture, 1996, 147: 93~105

[67]Volkman J K, Jeffrey SW , Nichols P D. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. [ J ] J Exp Mar Biol Ecol, 1989, 128: 219~240

附录



20×100 镜检轮虫摄食不同微藻

**a** 轮虫摄食聚球藻 **b** 轮虫摄食小球藻 **c** 轮虫摄食鱼腥藻衣藻

发表文章目录

淡水壶状臂尾轮虫的高密度培养技术[J] 生命科学仪器,2007 5(12):49-51 第一作者

The Study of Immobilizing and Removal Efficiency of  $Zn^{2+}$  from Waste water by  
synechococcus sp. [J] The 2nd International Conference on Bioinformatics and Biomedical  
Engineering 2008:p3410-3412 EI 收录 第一作者

The effect of food consumption and growth of rotifers with the different microalgae[J]  
Journal of Biotechnology (Supplement 1), 2008(136):PS565 SCI 收录 第一作者

轮虫的应用及营养成分的分析[J] 生命科学仪器, 2008 6(9):41-43 第一作者

轮虫对两种不同微藻饵料的摄食量[J] 安徽农业科学 2008(33):14560-14563 第一作者

不同微藻对轮虫生长及摄食量的影响[J] 内陆水产,2008,12:54-56 第一作者

## 致谢

在论文完成的过程中，除了我自己三年多来的潜心学习和研究之外，也凝聚了很多人的心血。所以在这里，我要对帮助我完成论文的所有人表示感谢。

首先衷心感谢我的导师邹宁教授。本文的研究工作是在邹老师的悉心指导下完成的，从论文的选题、研究计划的制定、技术路线的选择到成果发表，各个方面都离不开邹老师热情耐心的帮助和教导。在硕士研究阶段的三年来，邹老师认真的工作态度，诚信宽厚的为人处世态度，让我领会到了一个真正学者所应该具有的风采以及治学为人的道理，也为我今后的工作树立了优秀的榜样。正是在邹老师谆谆教诲、悉心指导和严格要求下，我才顺利完成论文内容。

近三年的学习和科研工作，不仅使我的知识结构和科研能力上了一个新台阶，更重要的是，各方面的素质都得到了提高。而这一切，都要归功于邹老师的深切教诲与热情鼓励。古人云：“一日为师，终生为父。”值此论文顺利完成之际，我再次向邹老师表示诚挚的谢意。

实验和学习期间，我得到了孙东红老师，孙振兴老师，王宜艳老师，孙虎山老师，王昌留老师，王晓安老师等的帮助，在此深表谢意！

感谢和我一个实验室的邱芳蕾、魏玉利、潘曰磊、刘胜臣、梁妍、丛山、吴电云同学，没有他们无私的帮助，我是无法完成论文工作的，同时感谢他们陪我度过的美好时光和带给我的所有快乐。

感谢我的挚友陈燕妮，于梅，李霞等等，和他们在一起度过了很多快乐，开心的日子。在她们的帮助下，我顺利的解决了生活中遇到的各种困难。

感谢我所有的亲人，陪我一起分担生活和学习中快乐和忧愁，感谢舅舅、舅妈一直以来对我的支持和帮助，作为我的坚强后盾，总是在我难以抉择的时候为我指明方向，给我最可靠的安全感和勇气。

最后深深的感谢呵护我成长的父母。回顾 20 多年来走过的路，每一个脚印都浸满着他们无私的关爱和谆谆教诲，10 多年的在外求学之路，寄托着父母对我的殷切期望。他们在精神和物质上的无私支持，坚定了我追求人生理想的信念。父母的爱是天下最无私的最宽厚的爱。大恩无以言报，惟有以永无止境的奋斗，期待将来辉煌的事业让父母为之骄傲。我亦相信自己能达到目标。

值此论文完成之际，谨向所有帮助过我，关心我的老师、同学、朋友和家人表达我最衷心的感谢和最诚挚的祝福！

刘文娟

2009 年 3 月 2 日