

李建军,蔡磊,余露军,等. 实验鱼生物饵料的质量控制 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(6): 135-139.
Li JJ, Cai L, Yu LJ, et al. Quality control of live food for laboratory fish [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(6): 135-139.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.06.020

实验鱼生物饵料的质量控制

李建军,蔡磊,余露军,黄韧*

(广东省实验动物监测所,广东省实验动物重点实验室,广州 510663)

【摘要】 实验鱼个体小,口径小,而微型配合饲料因为水中稳定性、诱食性、可消化性和污染水质等诸多缺点而应用有限。生物饵料具有大小合适、营养丰富,不污染水质等优势,被公认为是当今及今后较长时间内实验鱼的主要饲料。本文对大草履虫、褶皱臂尾轮虫、卤虫等实验鱼常用生物饵料的生物学特性、营养成分、可能携带的病原和有毒有害物质、质控指标等进行综述,以期实验鱼饲料的质量控制提供参考。

【关键词】 生物饵料;大草履虫;褶皱臂尾轮虫;卤虫;质量控制

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 06-0135-05

Quality control of live food for laboratory fish

LI Jianjun, CAI Lei, YU Lujun, HUANG Ren*

(Guangdong Laboratory Animal Monitoring Institute, Guangdong Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangzhou 510663, China)

【Abstract】 Laboratory fish are small in size and caliber, and their microdiet has limited uses because of poor stability, food inductivity, digestibility and water pollution. In contrast, live food is appropriately sized, rich in nutrition, and does not pollute the water quality; thus, it has long been recognized as the main feed for laboratory fish. Herein, we review the biological characteristics; nutrient composition; possible pathogens, toxins, and harmful substances; and quality control indexes of live food, such as *Paramecium caudatum*, *Brachionus plicatilis* and *Artemia salina*, which are commonly consumed by laboratory fish, to provide a quality control reference for laboratory fish feed.

【Keywords】 live food; *Paramecium caudatum*; *Brachionus plicatilis*; *Artemia salina*; quality control

实验动物饲料质量是与实验动物质量密切相关的重要条件,也是保证动物实验顺利进行和实验结果准确可靠的基础。实验鱼个体小,口径小,其微粒饲料应满足下列基本条件:1)符合实验鱼摄食习性、生理机能及不同生长时期的营养需求;2)水中稳定、悬浮、不结团,粒径合适;3)诱食,易被发现和捕食;4)适口,易消化吸收^[1]。近年来国内外微粒饲料的配方和制备工艺技术虽取得一定进步,但仍无法达到生物饵料饲喂的生长率和存活率^[2]。生物饵料指经过人工筛选的、可进行人工培养且适合养殖对象采食的生物,其具有适口、营养丰富、增殖快、增强抗病能力、对水质污染小等特点^[3],被公认为是当今及今后较长时间内实验鱼的主要饲料。

1 生物学特性

目前实验鱼的主要生物饵料有:大草履虫(*Paramecium caudatum*)、褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*)和卤虫(*Artemia salina*)等。

草履虫是浮游动物的重要组成部分,具有分布广、个体大、易培养、繁殖快等特点^[4],是斑马鱼等

【基金项目】 国家科技支撑计划项目(2015BAI09B05)。
【作者简介】 李建军(1972—),男,正高级工程师,研究方向:水生实验生物与生态毒理学。E-mail:lj@gdllami.com
【通信作者】 黄韧,研究员,研究方向:实验动物学。E-mail:1649405216@qq.com

许多水生经济动物幼体的开口饵料。目前世界上已报导草履虫 22 种,我国草履虫常见种为大草履虫(又称尾草履虫),隶属于纤毛纲(Ciliata)、膜口目(Hymenostomatida)、咽膜亚目(Peniculina)、草履虫科(Parameciidae)、草履虫属(*Paramecium*)。大草履虫长 180~280 μm ,繁殖适温 10℃~30℃,生长最适温度 25℃;适宜 pH 值 5.0~10.0,中性略偏酸环境生长较好,常在有机质较多的死水或缓流中生活^[5-6]。

轮虫属轮虫动物门(Rotifera)、轮虫纲(Rotifera)、真轮亚纲(Eurotatoria),其大小适宜、营养丰富、适应性强、繁殖快、易大量培养,是一种重要的水生动物饵料^[7]。其中使用最广泛的皱褶臂尾轮虫,大小在 150~360 μm 之间,分为 L 型和 S 型^[8]。

卤虫属节肢动物门(Phylum Arthropoda)、有鳃亚门(Subphylum Branchiata)、甲壳纲(Class Crustacea)、鳃足亚纲(Subclass Branchiopoda)、无甲目(Order Anostraca)、盐水丰年虫科(Family Branchinectidae)、卤虫属(*Artemia*)^[9]。无节幼体长 500~700 μm 、宽 180~250 μm ,不同品系大小略有差异;世界各大陆的盐湖、盐田等高盐水域中均有分布,传播的主要媒介为风和水鸟;幼虫适盐范围为 20~100,成虫为 10~25;耐温范围 6℃~35℃,生长最适温度 25℃~30℃;能耐 1 mg/L 低氧,也能生活于 1~1.5 倍饱和氧环境;孵化用水 pH 值 8~9 为宜,低于 8 孵化率降低;主要滤食 50 μm 以下的颗粒,5~16 μm 的颗粒摄食率较高,天然环境中以细菌、微藻和有机碎屑等为食。

2 营养成分

2.1 主要营养成分含量

草履虫营吞噬营养,细胞质中含有蛋白质、多糖和脂类等物质,含水率 75%~85%。

皱褶臂尾轮虫体内蛋白质含量占干重 28%~63%,脂类占 9%~28%,面包酵母培养的轮虫,其总脂类含量较低,延长藻类或经脂类强化的酵母的投喂时间可提高轮虫脂类含量^[10]。

脱壳后卤虫卵、初孵无节幼体和养殖成虫的总蛋白质含量分别为 43%~57%、54.6%~59.9% 和 55.6%~58.2%^[11];卤虫卵总脂肪含量为 17.98%,去壳卵粗脂肪含量 16.64%,初孵无节幼体脂肪占干重的 20.84~23.53%。卤虫卵及其初孵无节幼体

含较多的棕榈酸、棕榈油酸、油酸、亚麻酸、亚油酸。成虫除含有大量的不饱和脂肪酸外,还含较多维生素、胡萝卜素、抗坏血酸。卤虫休眠卵内甘油和海藻糖分别占干卵重的 5% 和 15%~17%^[12]。

2.2 营养成分影响因素

草履虫培养液的制备方法有多种,主要包括:稻草培养法、玉米培养液法、酵母片培养液法、沼液培养液法、麦粒培养液法及其他培养液法,另外,西瓜皮、香蕉皮、香瓜皮、桃子皮等材料以及池沼的禾本科植物或当年的禾本科农作物均可培养出草履虫^[13]。玉米穗、玉米粒培养液因营养丰富,能产生大量细菌,利于草履虫繁殖,培养效果较好。而荷叶、槐叶营养成分低,新鲜荷叶、槐叶在晾干过程中可能产生不利于细菌生长的物质,培育效果欠佳。

自然环境中的轮虫和卤虫营养价值全面。酵母培养的轮虫大多缺乏 N-3 系列高度不饱和脂肪酸,特别是 EPA 和 DHA,而海洋微藻中 EPA、DHA 含量较高,因此可选用 N-3 系列不饱和脂肪酸含量丰富的藻种如三角褐指藻、新月菱形藻、纤细角毛藻、球等鞭金藻、小球藻、微绿球藻等对酵母轮虫进行营养强化^[14]。

卤虫的营养成分与其品系、发育阶段、生存环境(特别是饵料条件)等因素有关^[11]。卤虫生长发育时,其体内的蛋白质含量逐渐增加,且随所摄取的饵料等因素的变化而变化。不同品系卤虫蛋白质含量不同。脂肪酸的组成及含量是影响卤虫营养价值的主要指标^[15]。不同品系卤虫脂肪酸含量不同,18:3 ω 3、18:4 ω 4、20:5 ω 5 含量尤其差别大^[16]。卤虫卵孵化是体内营养物质不断消耗的过程,其脂肪酸含量逐渐减少,特别是卵磷脂。即使是同一品系的卤虫卵,孵化条件不同,无节幼体含有的能量也不同。低盐高温孵化,卤虫初孵无节幼体含有的能量较多^[12]。

3 有毒有害物质

Mansouri-Aliabadi 等^[17]研究表明,重金属(锌、镍和铅)可通过食物传递到草履虫;陈伟琪等^[18]研究也显示,藻类、轮虫等海洋生物都能直接从海水中吸收铜,铜可沿着海水→扁藻→轮虫→仔虾进行传递;大连湾海域浮游生物体内 Pb 和 Cd 含量超过生物污染评价标准^[19]。钦州湾东部海域浮游生物 Cd、Hg 含量达 1.51×10^{-1} mg/kg 干重、 9.48×10^{-3} mg/kg 干重,远高于水体含量,呈现出重金属从水体

到浮游生物的迁移转化规律,浮游生物对重金属的富集系数最高达 40 000,表明浮游生物对重金属有很强的富集能力^[20]。因此,野生环境下的生物饵料(如草履虫、轮虫、卤虫)可富集水环境中的重金属等多种有毒有害物质,在使用生物饵料时应对其有毒有害物质含量进行检测评价。

由于各种来源的生物饵料质量良莠不齐,目前已有相关标准对生物饵料有毒有害物质进行规定,如 DB13/T 787-2006《褶皱臂尾轮虫土池养殖技术规范》^[21]和 DB13/T 789-2006《卤虫养殖技术规范》^[22]要求作为生物饵料的轮虫和卤虫有毒有害物质含量应严格低于 NY 5073《无公害食品 水产品中有毒有害物质限量》^[23]的规定。实践表明,实验室培育的草履虫、轮虫和质量较好的卤虫,其有毒有害物质含量可符合 NY 5073《无公害食品水产品中有毒有害物质限量》^[23]的要求(表 1),风险可控。

4 携带病原

国内外已有较多关于生物饵料可能携带致病微生物的报道,如卤虫卵和轮虫休眠卵可通过 PCR 方法检测到 WSSV 阳性^[24-25];宋晓玲等^[26]研究也显示桡足类、卤虫等可检出 WSSV;何建国等^[27]通过人工感染和 PCR 方法证明桡足类是 WSSV 的宿主,而且进一步证明桡足类是 WSSV 等病毒传播的

媒介生物之一。同时,生物饵料也是弧菌的重要携带者,Thompson 等^[28]、Gomezgil 等^[29]从海水轮虫中分离到多种弧菌;吴岗等^[30]从市售卤虫分离到 3 种优势弧菌;Bergh 等^[31]、Alvise 等^[32]研究表明卤虫和轮虫可传播水产上危害极大的鳃弧菌。鉴于生物饵料存在携带病原微生物风险,许多学者提出了加强卤虫卵等生物检验检疫的方法和策略,但尚无专门的病原检疫程序^[33]。

国内外已有学者成功培育无菌轮虫和无菌卤虫^[34-35],但生产上更多的是采用臭氧、消毒剂等方法消毒或益生菌定植培养等方法对轮虫、卤虫等生物饵料的致病微生物进行控制,并取得了非常理想的效果^[36-37]。从上述研究结果可知,使用生物饵料时应对其病原微生物进行检测和评价,经严格消毒控制或净化培育的草履虫、轮虫、卤虫等生物饵料携带病原风险可控。

5 推荐生物饵料质控要求

5.1 草履虫培育

5.1.1 草履虫引种时的纯化

将含有草履虫的液体吸入表面皿(或凹玻片)中,在显微镜或解剖镜下检查,用直径约 0.2 mm 的微吸管将表面皿(或凹玻片)中的草履虫逐个吸出(必要时用超纯水或去离子水反复稀释、冲洗)

表 1 实验室培育褶皱臂尾轮虫和卤虫有毒有害物质检测结果(mg/kg)				
Table 1 Detection results of toxic and harmful substances in <i>Brachionus plicatilis</i> and <i>Artemia salina</i> cultured in laboratory				
项目 Items	结果 Results		限量指标 Maximal residue limits	检测方法 Methods
	褶皱臂尾轮虫 <i>Brachionus plicatilis</i>	卤虫 <i>Artemia salina</i>		
铅 Lead	<0.1	0.43	≤0.5	GB 5009.12-2010/第一法 GB 5009.12-2010/ first method
无机砷 Inorganic arsenic	<0.1	0.24	≤0.5	GB/T 5009.11-2003/无机砷的测定第一法 GB/T 5009.11-2003/ determination of inorganic arsenic-first method
铜 Copper	<2	10	≤50	GB/T 5009.13-2003/第一法 火焰法 GB/T 5009.13-2003/ first flame method
镉 Cadmium	<0.02	0.022	≤0.5	GB/T 5009.15-2003/第一法 GB/T 5009.15-2003/ first method
多氯联苯(PCBS) Polychlorinated biphenyls	未检出 (检出限:0.01) No detection (detection limit: 0.01)	未检出 (检出限:0.01) No detection (detection limit: 0.01)	≤2.0	GB 5009.190-2014/第二法 GB 5009.190-2014/ second method
甲基汞 Methyl mercury	未检出 (检出限:0.2) No detection (detection limit: 0.2)	未检出 (检出限:0.2) No detection (detection limit: 0.2)	≤0.5	GB/T 500917-2003/甲基汞(气相色谱法) GB/T 500917-2003/ Methyl mercury (gas chromatography)

培养。

5.1.2 草履虫的培养

将纯培养的草履虫倒入至 500 mL 或 1000 mL 烧杯中,加适量除氯的自来水,每天滴加 1~2 滴新鲜配制浓度为 0.9~3.0 g/L 的酵母原液,在水温 22℃~28℃、pH 值 6.5~7.5 的条件下培养。培养过程尽量保持环境因子恒定。

5.1.3 草履虫的收集投喂

当培养液中草履虫密度较大时,收集培养液表面的草履虫,用仔鱼养殖水冲洗(必要时用 300~500 目筛绢过滤),稀释至每毫升 100~150 个的密度投喂。

5.2 褶皱臂尾轮虫培育

5.2.1 褶皱臂尾轮虫的纯化

将含有褶皱臂尾轮虫的液体吸入表面皿(或凹玻片)中,在显微镜或解剖镜下检查,用直径约 0.5 mm 的微吸管将表面皿(或凹玻片)中的褶皱臂尾轮虫逐个吸出(必要时用灭菌海水反复稀释、冲洗)培养。

5.2.2 褶皱臂尾轮虫的培养

培养用水需经砂滤、300 目的筛绢网过滤或其他方式处理以除去小型甲壳动物等敌害生物。盐度 15~25, pH 值 7.5~8.5, 温度 25℃~30℃, 溶氧 2.0 mg/L 以上,非离子氨 1.0 mg/L 以下,光照强度 500 lx 左右,可连续照明,也可间隔照明(如光暗周期为 18:6),或自然光照。

接种褶皱臂尾轮虫的密度每毫升不宜小于 0.1 个。宜采用海水小球藻培养,藻类密度约保持为每毫升 2.0×10^6 个细胞。如以酵母培养,投喂鱼苗前应采用海水小球藻进行营养强化 24 h 以上。连续充气,充气量不宜过大。经常检查轮虫的生长情况,轮虫死壳多,身体上附着污物,沉底、不活泼、不带卵或带冬卵为不良情况,应改进培养方法。

5.2.3 褶皱臂尾轮虫的投喂

投喂前经 60 目筛绢网过滤除去藻渣等杂质,300 目筛绢网收集轮虫。

5.3 卤虫孵化与投喂

5.3.1 卤虫卵的质量要求

可购买商品卵。卤虫卵孵化率 $\geq 80\%$, 含水率 $\leq 8.0\%$, 杂质 $\leq 1.0\%$ 。检验按 SN/T 0476 的规定执行。运输过程中应防止包装破损、日晒、雨淋。

卤虫卵应在低温($-20^\circ\text{C} \sim 4^\circ\text{C}$)、干燥、避光、密封环境下贮存。严禁与有毒、有害物品混合存放。开罐后卤虫卵应尽快使用。

5.3.2 卤虫卵的孵化

孵化前用 2%~3% 的福尔马林浸泡 10~15 min, 或次氯酸钠(有效氯达 20 mg/L)溶液浸泡 30 min, 然后用清水冲洗,也可采取其他消毒方法。孵化密度不宜超过每升 3.0 g 干重。水温 25℃~30℃、盐度 10~30、pH7.5~8.2,光照 1000~3000 lx,溶解氧大于 5.0 mg/L。连续充气,充气量以能把容器底部的虫卵充分吹起并使卵均匀分布为宜。

5.3.3 卤虫的投喂

投喂前去除空壳和未孵化的卤虫卵,用 150 目筛绢网袋收集、冲洗卤虫无节幼体。幼体孵出后 24 h 内投喂。也可投喂经清洗的脱壳卤虫卵。

6 小结

综上所述,大草履虫、褶皱臂尾轮虫、卤虫等浮游生物大小适宜,营养丰富,增殖迅速,便于实验室培养,对水质污染小,按质量控制要求培养携带病原和有毒有害物质风险可控,是实验鱼的优良饵料。

参考文献:

- [1] 王有基,胡梦红,瞿旭亮.微粒饲料在水产动物苗种培育中的应用研究[J].北京水产,2007,106(3):52-57.
- [2] 王素芬,王安利,胡俊荣.海洋鱼类育苗期配合饲料代替活饵的研究进展[J].海洋通报,2003,22(3):89-96.
- [3] 刘梅,朱曦露,苏艳秋,等.微藻和动物性生物饵料在水产养殖中的应用研究[J].海洋与渔业,2016,26(4):56-57.
- [4] 雷志华,李玉华,赵奇.不同细菌培养液对尾草履虫种群增长的影响[J].佳木斯大学学报(自然科学版),2018,36(6):946-948,976.
- [5] 房英春,肖友红.5种配方对草履虫生长及种群密度的影响[J].安徽农业科学,2009,37(15):7199-7200.
- [6] 史新柏.草履虫[J].生物学通报,1982,4:14-18.
- [7] 田宝军,李英文,丁茜,等.轮虫与卤虫在营养价值等方面的比较[J].河北渔业,2007,168(12):45-47.
- [8] 王大鹏,谢达祥,李长伙,等.斜带石斑鱼苗种繁育生物饵料选择与培养[J].江苏农业科学,2012,40(8):241-243.
- [9] 黄玉玲.卤虫人工孵化及增殖[J].广西水产科技,2004(1):34-36.
- [10] 刘文娟,邹宁,孙东红.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.
- [11] 隋丽英,王娇.不同品系卤虫卵的生物学测定值和营养组成

- 分析 [J]. 天津科技大学学报, 2014, 29(1): 46-50, 64.
- [12] 黄旭雄. 卤虫的营养 [J]. 水产科学, 2007, 26(11): 628-631.
- [13] 齐建红. 草履虫的采集分离、培养及保存新方法研究概述 [J]. 西安文理学院学报(自然科学版), 2011, 14(4): 30-32.
- [14] 张惠恋, 张路平. 草履虫的简便分离法及最佳培养液 [J]. 生物学通报, 1998, 33(8): 48.
- [15] 田宝军, 李英文, 丁茜, 等. 重要生物饵料轮虫与卤虫在营养价值营养强化等方面的比较 [J]. 齐鲁渔业, 2009, 26(2): 52-54.
- [16] 陈马康, 黄旭雄. 国产卤虫卵加工现状及质量检测 [J]. 齐鲁渔业, 2003, 20(7): 34-35.
- [17] Mansouri-Aliabadi M, Sharp RE. Passage of selected heavy metals from *Sphaerotilus* (bacteria; chlamydo bacteriales) to *Paramecium caudatum* (protozoa; ciliata) [J]. Water Research, 1985, 19(6): 697-699.
- [18] 陈伟琪, 蔡阿根, 李文权, 等. 铜在海洋食物链中的积累与传递规律的研究 [J]. 热带海洋, 1993, 12(4): 9-15.
- [19] 王树芬, 王家骧, 杨少辰, 等. 大连湾海水、底质和生物中 Cu、Pb、Zn、Cd 含量与分布 [J]. 大连水产学院学报, 1989, 4(2): 51-54.
- [20] 许允厚, 廖日权, 粟佳, 等. 钦州湾东部海域表层水和浮游生物中六种重金属含量和污染评价研究 [J]. 海洋与湖沼, 2017, 48(5): 960-969.
- [21] 河北省质量技术监督局. 褶皱臂尾轮虫土池养殖技术规范: DB13/T 787-2006 [S]. 2014.
- [22] 河北省质量技术监督局. 卤虫养殖技术规范要求: DB13/T 789-2006 [S]. 2006.
- [23] 中华人民共和国农业部. 无公害食品水产品中有毒有害物质限量: NY 5073-2006 [S]. 2006.
- [24] Chang YS, Lo CF, Peng SE, et al. White spot syndrome virus (WSSV) PCR-positive *Artemia* cysts yield PCR-negative nauplii that fail to transmit WSSV when fed to shrimp postlarvae [J]. Dis Aquat Org, 2002, 49(1): 1-10.
- [25] Yan DC, Dong SL, Huang J, et al. White spot syndrome virus (WSSV) detected by pcr in rotifers and rotifer resting eggs from shrimp pond sediments [J]. Dis Aquat Organ, 2004, 59(1): 69-73.
- [26] 宋晓玲, 史成银, 黄健, 等. 用 DNA 斑点杂交法检测对虾及其饵料和环境生物携带白斑综合症病毒状况的调查 [J]. 中国水产科学, 2001, 8(4): 36-40.
- [27] 何建国, 周化民, 姚伯, 等. 白斑综合症杆状病毒的感染途径和宿主种类 [J]. 中山大学学报(自然科学版), 1999, 38(2): 66-70.
- [28] Thompson F, Li Y, Gomezgil B, et al. *Vibrio neptunius* sp nov., *Vibrio brasiliensis* sp nov and *Vibrio xuii* sp nov., isolated from the marine aquaculture environment (bivalves, fish, rotifers and shrimps) [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2003, 53(1): 245-252.
- [29] Gomezgil B, Thompson F, Thompson C, et al. *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis* [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2003, 53(1): 239-243.
- [30] 吴岗, 王海青, 郭秀玲, 等. 一种新型聚维酮碘制剂对卤虫卵及无节幼体的活体消毒试验 [J]. 水产科技情报, 2017, 44(4): 205-209.
- [31] Bergh O, Vikanes L, Makridis P, et al. Uptake and processing of a *Vibrio anguillarum* bacterin in *Artemia franciscana* measured by ELISA and immunohistochemistry [J]. Fish Shellfish Immunol, 2001, 11(1): 15-22.
- [32] Alvise P D, Lillebo S, Prolgarcia M J, et al. *Phaeobacter gallaeciensis* reduces *Vibrio anguillarum* in Cultures of microalgae and rotifers, and prevents Vibriosis in Cod Larvae [J]. PLoS One, 2012, 7(8): 1-10.
- [33] 李富文, 王树成, 马艳, 等. 进境卤虫卵检疫监管初探 [J]. 检验检疫学刊, 2011, 21(6): 34-37.
- [34] 沈成媛, 丁国际, 穆丽, 等. 应用消毒剂建立宿轮虫的无菌培养系 [J]. 环境科学学报, 2010, 30(1): 72-78.
- [35] Tinh N, Phuoc N, Dierckens K, et al. Gnotobiotically-grown rotifer *Brachionus plicatilis* sensu strictu as a tool for evaluation of microbial functions and nutritional value of different food types [J]. Aquaculture, 2006, 253: 421-432.
- [36] Tolomei A, Burke CM, Crear BJ, et al. Bacterial decontamination of on-grown *Artemia* [J]. Aquaculture, 2004, 232(1): 357-371.
- [37] Prolgarcia MJ, Pintado J. Effectiveness of probiotic *Phaeobacter* bacteria grown in biofilters against *Vibrio anguillarum* infections in the rearing of Turbot (*Psetta maxima*) Larvae [J]. Mar Biotechnol (NY), 2013, 15(6): 726-738.

[收稿日期] 2019-12-03