第12卷 第1期
2000年3月

湖 泊 科 学
JOURNAL OF LAKE SCIENCES

Vol. 12, No. 1
Mar., 2000

培养液更换对萼花臂尾轮虫(*Brachionus calyciflorus*)休眠卵形成的影响*

席贻龙** 黄祥飞
(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

提 要 在种群累积培养状态下研究了培养液更换对萼花臂尾轮虫(*Brachionus calyciflorus*)休眠卵形成的影响. 结果表明, 在培养液不予更换的情况下, 萼花臂尾轮虫休眠卵的产量和形成效率分别为 724.3333±40.5257ind.(6d·20mL)$^{-1}$和 6.0361±0.3377ind.(5×10^{6} cells)$^{-1}$(algae diet). 与之相比, 当培养液每2天更换一次时, 其休眠卵的产量和形成效率分别下降至 637.3333±16.8028ind.(6d·20mL)$^{-1}$和 5.3111±0.1400ind.(5×10^{6} cells)$^{-1}$(algae diet). 随着培养液更换频率增大至每天一次时, 其休眠卵的产量和形成效率下降的幅度进一步增大. 培养液更换对轮虫种群中的混交雌体百分率和混交雌体受精率无显著的影响. 最后探讨了培养液更换对萼花臂尾轮虫休眠卵形成影响的机理.

关键词 萼花臂尾轮虫 培养液更换 休眠卵 产量 形成效率
分类号 Q959.181

作为最简单的方法之一, 分批培养法(Batch culture method)已被广泛地应用于轮虫休眠卵的规模化生产研究. 但由于在培养过程中, 轮虫混交雌体百分率常随种群增大到一定程度后而停止增大, 培养时间的延长并不能提高休眠卵的形成效率[1]. 在有关食物种类和浓度对萼花臂尾轮虫(*Brachionus calyciflorus*)休眠卵形成的影响研究中, 作者也得出了相似的结果①. 在另一个研究中, 作者还发现, 将培养过轮虫的培养液经孔经为 0.45μm 微孔滤膜过滤后再用于轮虫的培养, 结果使种群的混交雌体百分率和休眠卵产量皆显著下降②. 可否通过培养液的更换以提高轮虫混交雌体百分率和休眠卵的产量值得进一步的研究. 本文报道了这方面的研究结果, 供参考.

1 材料与方法

1.1 轮虫的来源和培养

实验用萼花臂尾轮虫于1997年3月由武汉东湖水体沉积物中的休眠卵孵化而得. 实验室内于温度为25±1℃、自然光照(光照强度约30 Lx, L:D=14:10)下进行"克隆"培养, 培养液采用 Gilbert 的配方[2], 所用饵料为 HB-4 培养基[3]培养的、处于指数增长期的蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*). 轮虫培养时间在2个月以上, 以休眠卵保种.

---

* 国家自然科学基金资助项目(39870158).
收稿日期: 1999-02-07; 收到修改稿日期: 1999-05-24. 席贻龙, 男, 1965年生, 博士, 教授.
** 现通迅地址: 安徽师范大学生物系(芜湖 241000).
① 席贻飞, 黄祥飞. 食物种类和浓度对萼花臂尾轮虫休眠卵形成的影响. 动物学报, 2000(待刊).
② 席贻飞、黄祥飞. 培养液质量对萼花臂尾轮虫休眠卵形成的影响(待发表).

1.2 群体累积培养实验

实验共设3组，每组3个重复．第Ⅰ组为整个培养过程中培养液原则上不更换；第Ⅱ组为培养过程中，每2d更换一次培养液；第Ⅲ组为每天更换一次培养液．培养液更换的量皆为培养液体积的50%．以容积为25mL的磨口称量瓶为培养容器，培养液体积为20mL；以浓度为5.0×10^6cells mL^{-1}的蛋白核小球藻作为轮虫的饵料；实验在温度为25±1℃、光照强度约120 Lx(L:D=14:10)下进行．实验前，将轮虫在同等条件下预培养48h以上．之后，用玻璃微吸管随机吸取龄长在2h以内的幼体，待其产出第一枚非混交卵时接种至各培养液内开始实验．实验过程中，每12h用玻璃微吸管轻轻吹浮沉积于培养容器底部的藻类食物；每24h对培养液中轮虫各类型雌体、雄体及休眠卵计数一次，并吸出培养容器底部的沉积物和休眠卵，更换培养液，投喂饵料．实验共进行6d．

1.3 雌体类型的划分和鉴别

根据雌体是否带卵以及所带之卵的形态特征，将雌体分为以下四类：

(1) 未携卵雌体：包括处于幼体阶段而尚未产卵的雌体、卵已产完而处于衰老阶段的雌体以及终生不产卵的雌体；

(2) 非混交雌体：产非混交卵．非混交卵无色、透明、可见胚胎发育过程，尤其在胚胎发育早期可见咀嚼器的几丁质板；其长、宽一般在(100－110)μm×(75－85)μm之间；

(3) 产雄卵的混交雌体：所产之雄卵数目一般在5个以上；个体较小，其体积约为非混交卵的2/3；

(4) 产休眠卵的混交雌体：所产之卵皆为具厚壳的休眠卵．

1.4 轮虫及其休眠卵的计数方法

对轮虫的计数，采用抽样计数法．抽样计数时，根据培养过程中轮虫各类型雌体和雄体密度的不同，用0.5或1mL玻璃吸管将培养液轻轻搅匀后，从培养容器的三个不同部位、于水柱中部吸取0.5－1mL的培养液进行计数．至于其中的未携卵雌体，则将其置于容积为2mL的特制玻璃杯中进行隔离培养．根据各雌体的产卵性质确定其类型，将24h内类型已确定的雌体个数记入抽样计数当天的结果中，并将其移回原培养液中；未携卵雌体则继续在此状态下培养24h，如仍未见产卵，则视为不产卵或卵已产完而进入衰老阶段的雌体．

休眠卵则采取全部计数的方法，隔离培养中所产之休眠卵记入观察当天的休眠卵总数中．

1.5 有关参数的定义和计算方法

(1) 轮虫雌体的生产量：参照Snell等[4]方法，通过计算各自的种群增长曲线与X-轴间的面积获得．

(2) 混交雌(雄)体百分率：种群中的混交雌(雄)体数占总雌(雄)体数的百分比；

(3) 休眠卵产量：特定时间(6d)、特定体积(20mL)培养液内所形成的休眠卵数量(ind)；

(4) 休眠卵形成效率：以培养过程中每投喂5.0×10^6cells蛋白核小球藻所产休眠卵的平均数量(ind)．

2 结果

2.1 轮虫的种群动态

由图1中可见，培养Ⅰ组中，轮虫总雌性种群在培养开始后的第3－5天较稳定．与之相

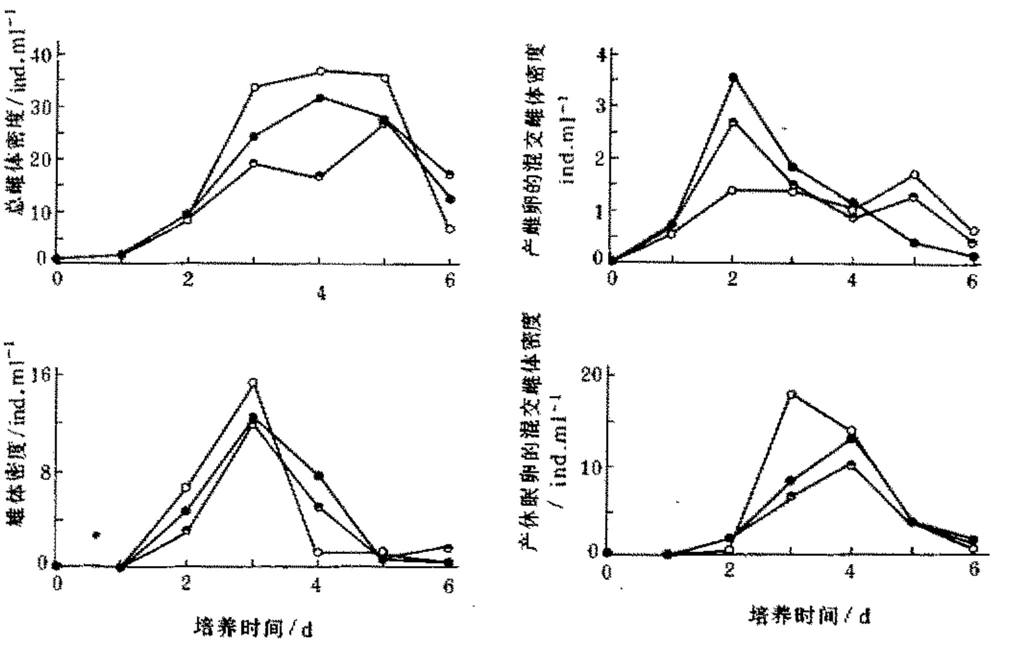

图 1　不同培养状态下萼花臂尾轮虫的种群动态

Fig.1　Population dynamics of *B. calyciflorus* under different culture conditions

● Ⅰ组(Group Ⅰ)　◐ Ⅱ组(Group Ⅱ)　○ Ⅲ组(Group Ⅲ)

比,培养Ⅱ组中的轮虫种群皆在培养液更换后 24h 下降,培养Ⅲ组种群波动更为剧烈.产雄卵的混交雌体密度以培养Ⅰ组低而稳定,其峰值在第 5 天出现;其它两组波动较大,密度的高峰值都出现在第 2 天.三组中,雄体密度的高峰值均出现在第 3 天,而产休眠卵的混交雌体密度的高峰值出现的时间,培养Ⅰ组为第 3 天,其余两组为第 4 天.

六天内,轮虫总雌体和产休眠卵的混交雌体的生产量均以培养Ⅰ组最大,培养Ⅲ组最小,三组间具有显著的差异($P<0.05$)(表 1).

2.2　轮虫休眠卵的形成动态及其产量和形成效率

不同培养状态下,轮虫休眠卵日生产量的高峰值皆出现在培养开始后的第 4 天(图 2).六天内,休眠卵产量和形成效率均以培养Ⅰ组最大,培养Ⅲ组最小,三组间具有极显著的差异($P<0.001$)(表 2).

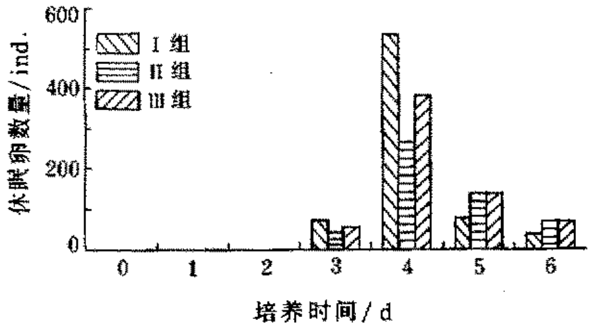

图 2　不同培养状态下轮虫休眠卵的形成动态

Fig.2　Formation dynamics of resting egg of *B. calyciflorus* under different culture conditions

表 1 不同培养状态下轮虫的生产量

Tab.1 Production of *B. calyciflorus* under different culture conditions

培养组别	总雌体生产量	产休眠卵的混交雌体生产量
Ⅰ组	118.9967±21.1460	37.8100±8.6536
Ⅱ组	100.8317±5.0840	28.4033±0.5519
Ⅲ组	80.7276±9.8742	22.3833±3.3346

表 2 不同培养状态下轮虫休眠卵的产量和形成效率

Tab.2 Production and formation efficiency of resting egg of *B. calyciflorus* under different culture conditions

培养组别	产量/ind.(6d·20mL)$^{-1}$	形成效率/ind.(5.0×10^{6} cells)$^{-1}$(algae diet)
Ⅰ组	724.3333±40.5257	6.0361±0.3377
Ⅱ组	637.3333±16.8028	5.3111±0.1400
Ⅲ组	501.3333±40.0041	4.1778±0.3333

2.3 轮虫种群中的混交雌体百分率和受精率

图 3 显示不同培养状态下萼花臂尾轮虫混交雌体百分率和受精率的动态变化.6 天内种群的混交雌体百分率和受精率平均值的统计分析显示,三组间皆无显著差异($P>0.05$).

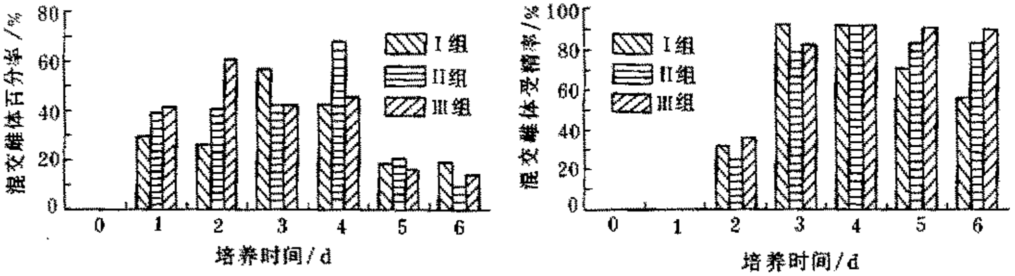

图 3 不同培养状态下轮虫的混交雌体百分率和受精率

Fig.3 Mixis and fertilization rate of *B. calyciflorus* under different culture conditions

3 讨论

3.1 培养液更换与轮虫的种群动态

有关培养液更换对轮虫休眠卵形成的影响如何,至今未见报道.相近的研究仅见 Balompapueng 等有关半连续培养法对褶皱臂尾轮虫(*Brachinous plicatilis*)种群动态影响的报道[4].其结果表明,采取定期更换培养液和采收部分轮虫等途径,在一定程度上可避免因轮虫排泄废物等的积累而导致种群突然崩溃现象的发生,但该方法会使轮虫种群出现波动.究其原因,可能与培养液中某些细菌群落的不稳定性有关[5].本研究的培养Ⅱ和Ⅲ组中,虽然只定期更换部分培养液而不采收轮虫,但轮虫种群在增长过程中皆出现波动,波动的幅度随培养液更换频

率的增大而增大.这是否也与培养液中某些菌落的不稳定性有关,有待进一步研究.

3.2 培养液更换与轮虫的混交雌体百分率和受精率

有关培养液更换对轮虫混交雌体百分率的影响,已有一些报道.Hino 等研究发现,培养液的更换抑制褶皱臂尾轮虫混交雌体的产生.其原因可能与培养液中某些不明的诱导因子浓度的降低有关[6].Balompapueng 等的研究结果表明,培养过程中每两天更换一次培养液时褶皱臂尾轮虫的混交雌体百分率降低,但每四天更换一次培养液却使混交雌体百分率有所提高,其原因尚未明了.而培养液更换对混交雌体受精率无显著的影响[5].本研究结果表明,培养液更换对萼花臂轮虫混交雌体百分率和受精率皆无显著影响.

3.3 培养液更换影响轮虫休眠产卵量的机理的探讨

迄今为止,人们普遍认为,轮虫休眠卵的形成与众多的内源性及外源性因素有关,它们通过影响轮虫种群中的混交雌体百分率和受精率以及产休眠卵的混交雌体的产卵量而影响休眠卵的形成及其幅度[7].就特定的种群而言,种群中混交雌体百分率和受精率大小的影响可以归结为对产休眠卵的混交雌体形成数量的影响.但对不同的种群来说,产休眠卵的混交雌体的数量还与种群本身的密度有关①.本研究中,虽然各组间轮虫的混交雌体百分率和受精率无显著的差异,但由于各组间轮虫总雌体的生产量不同,由此导致产休眠卵的混交雌体的生产量也不相同.这可能是各组间休眠卵产量存在极显著差异的主要原因之一.当然,产休眠卵的混交雌体的产卵量是否存在差异有待于进一步的研究.

3.4 轮虫休眠卵规模化生产的方法问题

已有文献资料表明,适合于轮虫休眠卵规模化生产的方法常因种而异.分批培养法适合于 *B. rotundiformis* 休眠卵的规模化生产,而半连续培养法则可使褶皱臂尾轮虫休眠卵的形成效率提高[1].上述两类方法中哪一种更适合于萼花臂尾轮虫休眠的规模化生产有待于进一步研究.

参 考 文 献

1 Hagiwara A, Balompapueng M D, Munuswamy N, *et al*. Mass production and preservation of the resting eggs of the euryhaline rotifer *Brachionus plicatilis* and *B. rotundiformis*. *Aquaculture*, 1997, **155**:223－230

2 Gilbert J J. Mictic female production in rotifer *Brachinous calyciflorus*. *J. Exp Zool*, 1963, **153**:113－124

3 章宗涉,黄祥飞.淡水浮游生物研究方法.北京:科学出版社,1991.340－344

4 Snell T W, Hoff F H. The effect of environemntal factors on resting egg production in the rotifer *Brachinous plicatilis*. *J World Marical Sco*, 1985, **16**:484－497

5 Balompapueng M D, Hagiwara A, Nishi A, *et al*. Resting egg formation of the rotifer *Brachionus plicatilis* using a semi-continuous culture method. *Fisheries Science*, 1997, **63**(2):236－241

6 Hino A, Hirano R. Ecologigal studies on the mechanism of bisexual reproduction in the rotifer *Brachinous plicatilis*, I. General aspects of bisexual reproduction. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1976, **42**:1093－1099

7 Pourriot R, Snell T W. Resting eggs of rotifers. *Hydrobiology*, 1983, 147:245－255

① 席贻飞,黄祥飞.食物种类和浓度对萼花臂尾轮虫休眠卵形成的影响.动物学报,2000(待刊).

Effect of Culture Water Replacement on Resting Egg Formation of Freshwater Rotifer, *Brachionus calyciflorus*

XI Yilong HUANG Xianfei

(*Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan* 430072, *P.R. China*)

Abstract

The effect of culture water replacement on resting egg formation of freshwater rotifer, *Brachionus calyciflorus*, was studied under conditions of population accumulative culture. The results showed that when the rotifer was cultured by batch culture method, the production and formation efficiency of resting egg were 724.3333 ± 40.5257 ind. $(6d \cdot 20mL)^{-1}$ and 6.0361 ± 0.3377 ind. $(5 \times 10^6$ cells$)^{-1}$(algae diet), respectively. When the water replacement was made at every two days interval, the production and formation efficiency of resting egg decreased to 637.3333 ± 16.8028 ind. $(6d \cdot 20mL)^{-1}$ and 5.311 ± 0.1400 ind. $(5 \times 10^6$cells$)^{-1}$(algae diet), respectively. The extent of the decline increased with the increment of water replacement frequency. There were no different effects of water replacement on the mixis and fertilization rate. The mechanism of the effects was also discussed.

Key Words *Brachionus calyciflorus*, culture water replacement, resting egg, production, formation efficiency