

# 一种耐高温大型溞 HB 的培养和生物学的初步研究\*

孙美娟 张甬元 蔡俊鹏

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

## 提 要

本文介绍了夏季在武汉鱼池所采的耐高温大型溞 (*Daphnia magna* HB), 对其生长繁殖及其实验室条件下溞的种群密度、食物、温度和光照强度对生长、发育的影响, 并对其培养和保种方法进行了研究。连续3年实验室的培养表明, 在以新鲜藻类为食物的情况下, 此种溞在15—31℃时能正常生长、繁殖。在31℃时, 其最大体长为3.65mm, 最高怀卵量为26个。

根据国际标准法组织所介绍的 (ISO 6341) 对标准毒物——重铬酸钾的敏感性试验, 24h EC<sub>50</sub> 为 0.92mg/L(20℃)。

**关键词** 大型溞 HB, 耐高温, 培养, 生长和繁殖

由于溞个体大, 易培养, 且对毒物敏感, 故把它作为一种重要的生态毒理学测试动物。有关大型溞的培养, 国内外已有报道<sup>[1-3, 14]</sup>。由于大型溞分布于气温较低地区, 温度适应范围较窄, 从而在夏季温度高的地区, 给大型溞的常年保种和试验带来一些困难。因此, 选育一种耐高温范围较宽的试验溞种是十分有意义的。

本文以生态毒理试验为目的, 对从武汉鱼池中采捕的大型溞 (*Daphnia magna* HB) 进行了纯系分离培养, 研究了在实验室条件下的生长、繁殖规律及影响因子, 发展了相应的能维持稳定生长的培养方法。实验结果表明, 这种大型溞具有较大的温度适应能力, 并在温度为31℃时仍能正常生长、繁殖, 为我国高温地区开展大型溞的培养提供了方法和经验, 也有助于对溞的生态和生物学研究。

## 材 料 与 方 法

**1. 培养液** 用活性炭柱处理的自来水作培养液。活性炭柱长80cm、直径4cm, 流速约100ml/min, 柱外遮光, 以免长藻。柱出口用双层直径为64μm的尼龙筛绢包裹。

**2. 食物** 以新鲜的斜生栅藻 (*Scenedesmus obliquus*) 为饵。用动态培养或静止培养(每天至少摇两次)<sup>[4]</sup>。采用自然沉淀法将培养的栅藻液浓缩。在温度20℃以上时, 浓

\* 本研究属中国科学院科学基金资助课题。

本文承黄祥飞副研究员审阅, 陈受忠副研究员鉴定溞种, 特此致谢。

1988年8月10日收到。

藻极易变质,故要经常摇动,较长时间不用时需更换新鲜培养液。培养器皿按常规经常消毒。

**3. 大型蚤 HB 的纯系分离** 在 8 月份从本所鱼池采捕的大型蚤经室内驯养,选出体质健壮个体,并以单个抱卵雌体经孤雌生殖所生子代,从子代中多次选育,以体质强、繁殖率高的个体作继续培养。

**4. 大型蚤 HB 幼体的培养** 纯系分离选得的亲体所产幼体用尼龙筛分离<sup>[3]</sup>,吸管吸出置于 500ml 有培养液和食物的烧杯中,幼体密度为每 5ml 培养液 1 个。光照 800—1200lx,光/暗周期各 12h。每天观察 1—2 次,吸去蚤皮和沉淀物。然后用吸管充气(操作谨慎)使藻类悬浮于水中。每 1—2 天投饵一次,投饵量以培养液明显绿色为准。每周换水 2—3 次。待幼体脱皮 3 次后,培养密度为 1 个/10ml。

**5. 大型蚤 HB 母体的培养** 幼体发育性成熟后,培养密度为 1 个/10—12ml,日常管理同上。选留每批母体第 3—5 次产出幼体为蚤种,继续繁殖。

## 结果与讨论

### (一) 不同温度下大型蚤 HB 生长繁殖规律

**1. 龄期和龄数** 蚤体被一壳所包裹,每脱皮一次后,当外壳未硬化前瞬间增长,每脱皮一次为 1 龄。两次脱皮之间的时间为龄期。大型蚤 HB 在不同时间的龄期见表 1。温度越低,龄期越长;温度越高,龄期越短。结果表明,大型蚤 HB 最大龄数在 20℃ 时为 18 龄,25 和 28℃ 时均为 16 龄,31℃ 时为 15 龄。

表 1 不同温度下大型蚤 HB 的龄期\*

Tab. 1 Duration of *D. magna* HB at different temperature

龄期 Stadium of instar	20℃ 天(Day)	25℃ 天(Day)	28℃ 天 (Day)	31℃ 天 (Day)
1—2	1	1	1/2—5/6	1/2—5/6
3—4	2	1	1	1
≥5	3	2.5	2	2

\* ① 蚤培养密度为 1 个/20 ml, 每级温度有蚤 10—20 个;② 10 龄后部分龄期更长些

表 2 大型蚤 HB 各龄的平均体重(20℃)

Tab. 2 Average body weight of *D. magna* HB at different stadia

龄期 Stadium of instar	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
平均体重 (mg/10 个) Mean weight n = 5	0.63 ±0.04	1.11 ±0.08	1.69 ±0.23	3.84 ±0.27	7.16 ±0.63	15.78 ±0.49	25±0.50	33.26 ±0.85	41±1.59	49.98 ±2.4

**2. 体长** 蚤的生长速度随龄数增加而有相对减慢的变化。幼龄高速生长,成龄前期

为中速、后期为缓慢生长期<sup>[7]</sup>。大型蚤 HB 体长的增长曲线(图 1)以 20℃ 时最快, 随温度增高而逐步减慢。最终平均体长在温度 20、25、28 和 31℃ 时分别为 5.76、4.68、4.17 和 3.65mm 与报道的有差异<sup>[1]</sup>。

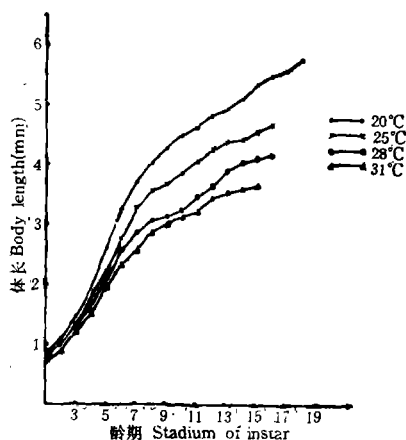


图 1 不同温度下大型蚤 HB 体长的变化

Fig. 1 Changes in body length of *D. magna* HB with temperature

母体产出的幼体大小随母体龄数而变化, 第 3 胎孵育囊内幼体组成的平均体长比早期和晚期的大<sup>[12]</sup>。母体在第 3 胎产卵后的生殖量增大。将母体产出的第 3—5 胎幼体选取部分留种, 并选用第 3—8 胎幼体进行毒性试验。

**3. 体重** 大型蚤 HB 在 5 龄后, 因怀卵而体重增加很快(表 2)。

**4. 产卵量和存活率** 蚤在适合条件下进行孤雌生殖。在室温 18—23℃ 时, 大型蚤的幼龄期不少于 5 龄<sup>[13]</sup>。大型蚤 HB 4 龄前未成熟者为幼体, 5 龄后以开始繁殖者为成体, 大型蚤 HB 的产卵量在 25℃ 最高(图 2)。在同一温度下大型蚤

HB 每胎最高产卵数和累计产卵数均比报道的高<sup>[1]</sup>(表 3), 每胎最大产卵量高 1.3—2.7 倍, 累计产卵数在 25℃ 高两倍。

表 3 大型蚤在不同温度下产卵数的变化

Tab. 3 Comparisons of total number of eggs and maximum number of eggs/brood of between *D. magna* from different sources

	20℃	25℃	28℃	31℃	数据来源 Source of data
每胎最高产卵数(个) Maximum number of eggs/brood	86	96	45	26	本文
	37	26.3	—	—	宋大祥 <sup>[1]</sup>
累计产卵数(个) Total number of eggs	306	447.3	162	62	本文
	276.6	146.3	—	—	宋大祥 <sup>[1]</sup>

大型蚤正常生长、繁殖的温度范围在 15—25℃, 培养时水温达到 27℃ 以上, 雌雄比例朝有利于雄性发展, 31℃ 时全是雄性个体<sup>[9]</sup>, 一个世代即告结束。而大型蚤 HB 则有较大的温度适应能力, 25℃ 的产卵数比 20℃ 高, 且在成龄后期每胎产卵数还不断增加, 并在所试温度范围内均能正常生长、繁殖。不同龄期对温度耐受能力有一定的差别(图 3)。10 龄前, 20—31℃ 的存活率均为 100%; 而 10 龄后, 温度增高则存活率有所下降。此外就存活时间而言, 26℃ 为 32—60 天, 25℃ 为 19—33 天, 28℃ 为 14—31 天, 31℃ 则为 13—23 天。

## (二) 食物对大型蚤生长、发育的影响

枝角类对食物的选择不是根据食物的类型, 而是根据食物的颗粒大小而定<sup>[14]</sup>。水蚤

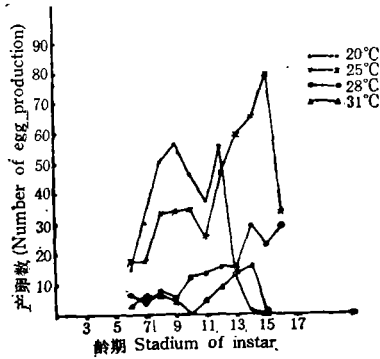


图2 大型蚤 HB 在不同温度下产卵数的变化

Fig. 2 Number of eggs produced by *D. magna* HB at different temperature

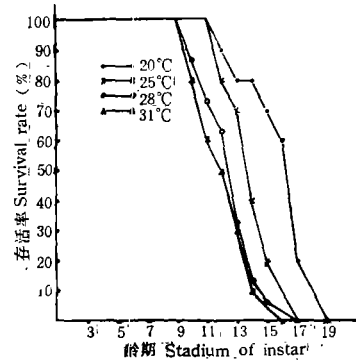


图3 不同温度下大型蚤 HB 存活率的变化

Fig. 3 Changes in survival rate of *D. magna* HB with temperature

摄食直径为 1—15  $\mu\text{m}$  内的颗粒, 而最适大小为 2—4  $\mu\text{m}$ 。投喂的栅藻其直径为 2—8  $\mu\text{m}$  的单细胞藻类, 是大型蚤的理想食物。食物量不足会影响大型蚤的生长、繁殖(表 4), 虽然食物充足组 10 天换一次水, 但 10 天后蚤的平均体长都比食物不足组大, 成体的怀卵量也多。

表 4 食物量对大型蚤 HB 生长和发育的影响

Tab. 4 Effects of quantity of food on the growth and development of *D. magna* HB

培养时间(天) Culture time (day)	食物不足 Restricted feeding	食物每天有余 Ad libitum
8	发育一致, 全部达到性成熟, 每个成体怀卵 1—8 个, 已产出少量幼体	个体发育一致, 全部达到性成熟, 每个成体怀卵数很多, 已大量产卵
10(n = 10)	平均体长 $2.87 \pm 0.135\text{mm}$	平均体长 $3.58 \pm 0.12\text{mm}$

注: 食物不足: 6h 后培养液无绿色, 3 天换水一次。

食物每天有余: 24h 后培养液仍为明显绿色, 10 天换水一次。

食物水平影响雌体的大小, 也直接影响每一雌体的怀卵量<sup>[15]</sup>。食物量究竟多少才合适? 结果表明, 栅藻的个体较大, 45 万个/ml 已敷需要, 而小球藻至少需要 200 万个/ml 水中方能保证大型蚤的正常生长和发育<sup>[1]</sup>。我们在 500ml 培养液中放入 50 个成体蚤(6—7 龄), 培养液计数含栅藻细胞 200 万个/ml, 测得  $\text{OD}_{650}$  为 0.1, 24h 后培养液绿色消失。如果培养液含藻细胞 100 万个/ml, 放 3—4 龄幼体 50 个, 测得  $\text{OD}_{650}$  为 0.05, 48h 后培养液绿色消失。由于蚤的摄食方式是滤食性的, 滤取食物量与培养液中细胞浓度有关: 浓度越大, 滤取食物越多。因此, 以 50 个蚤计, 每天成体的食物密度为 200 万个/ml, 幼体为 50 万个细胞/ml 是合适的。还观察到食物在水中悬浮时间的长短对大型蚤的生长也有影响。

### (三) 种群密度对大型蚤 HB 生长发育的影响

种群密度对其生长、繁殖有影响(表 5)。蚤的培养密度一般为 1 个/20ml 较好, 蚤的密度在 1 个/10—20ml 的产卵数和死亡率差别不大, 但平均体长略小些。因此, 在食物丰

富、水质清新的情况下,蚤的培养密度为 1 个/10ml 是可行的。若蚤密度过大,往往因食物不足和水质恶化而使蚤出现个体差异和性成熟不一致,有时发生死亡。密度为 1 个/4ml 的蚤性成熟迟,且个体小,产卵量少,个别排出未成熟卵和蚤死亡率高。

表 5 不同蚤密度下大型蚤 HB 的生物学特性

Tab. 5 Biological characteristics of *D. magna* HB at different Daphnia densities

蚤密度 <sup>①</sup>	1 个/4ml			1 个/10ml			1 个/20ml		
	平均体长 (mm)	平均产卵 数(个) <sup>⑤</sup>	存活率 (%) <sup>⑥</sup>	平均体长 (mm) <sup>④</sup>	平均产卵 数(个) <sup>⑤</sup>	存活率 (%) <sup>⑥</sup>	平均体长 (mm) <sup>④</sup>	平均产 卵数 (个) <sup>⑤</sup>	存活率 (%) <sup>⑥</sup>
特性 <sup>②</sup>									
龄期 <sup>③</sup>									
1	0.84±0.032		100	0.84±0.028		100	0.83±0.053		100
2	1.02±0.045		100	1.03±0.054		100	1.04±0.037		100
3	1.24±0.086		100	1.26±0.087		100	1.30±0.067		100
4	1.68±0.141		100	1.49±0.147		100	1.55±0.082		100
5	1.90±0.120		100	1.91±0.063		100	2.02±0.117		100
6	—		100	2.36±0.106		100	2.51±0.227		100
7	—		100	2.70±0.193	9	100	2.81±0.165	8	100
8	2.63±0.242	7.31	96	3.17±0.219	11.9	100	3.25±0.266	14.5	100
9	2.83±0.161	—	84	3.32±0.174	12.3	100	3.35±0.226	8.3	100
10	3.17±0.078	3.7	54	3.40±0.144	—	100	—	11	100
11	3.27±0.098	4.0	28	—	2.4	90	3.45±0.310	3.1	90
12	3.35±0.309	12.1	20	3.69±0.234	7.3	90	3.49±0.280	6	90
13	3.51±0.337	1.0	10	3.73±0.133	11.4	90	3.75±0.249	7.8	80
14				3.82±0.119	17.4	90	3.92±0.238	25.5	80
15				3.92±0.117	25.0	70	4.05±0.149	25.0	70
16				4.27±0.130	31.0	70	4.34±0.239	28	70
17				4.31±0.142	34.0	50	4.38±0.211	31	50

① population density; ② Characteristics; ③ Stadium of instar; ④ Mean length±S.D. (n+10);

⑤ Mean number of eggs produced; ⑥ Survival rate(%).

#### (四) 温度变化对大型蚤生长、发育的影响

温度对蚤生长、发育的影响,国内外已有许多研究<sup>[1,5-7,14]</sup>。但在室内培养中温度变化对蚤生长和发育的影响未见报道。在室内恒温培养时,突然降温至 5℃ 以上时,怀卵母体将卵吸收(不是因饥饿引起的),但蚤仍然按时脱皮。当温度恢复稳定后,有的母体能恢复产卵,而有的仍是脱皮,怀卵,重吸收,如此循环直至死亡。若突然降温的温差在 5℃ 以内,母体则推迟产卵。如果将 20℃ 时母体产出的幼体直接培养于 31℃,则蚤体发育慢,性成熟迟(图 4,5),个别在 10 龄才产卵,而大部分则到 13 龄才产卵。成体蚤最大体长仅 3.74mm。存活时间只少数达 19 龄。

为使 20℃ 培养的大型蚤 HB 在 28—31℃ 正常生长、发育,可将母体产出的幼体先在 25℃ 下培养,适应温度后选出健壮和怀卵多的母体,并取其所产幼体放入 28—31℃ 下培养,经过 1—2 代连续培养后选出健壮和怀卵多的母体取其所产幼体继续培养,就能在高温下正常生长和发育(图 4,5)。经过两代高温驯化培养后,28℃ 时每胎最高产卵数达 76 个,平均累计产卵数为 369.8 个,存活时间 14—23 天; 31℃ 时每胎最高产卵数为 45

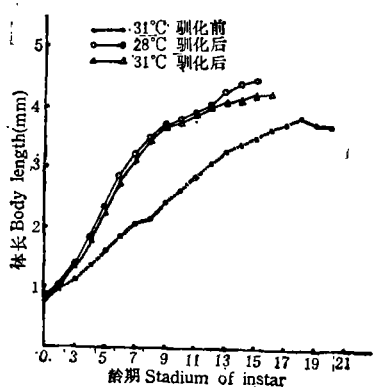


图4 高温驯化前后大型蚤 HB 体长的变化

Fig. 4 Changes in body length of *D. magna* HB before and after acclimation to high temperatures

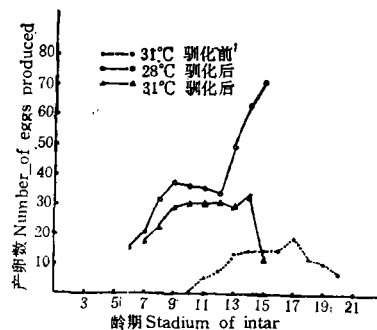


图5 高温驯化前后大型蚤 HB 产卵数的变化

Fig. 5 Changes in the number of eggs produced by *D. magna* HB before and after acclimation to high temperatures

个,平均累计产卵数为 235.4 个,存活时间 13—21 天。

蚤对温度变化较敏感,它的生长和发育随温度变化而不同。因此,大型蚤培养时温度变化只能逐渐升高和降低,温差不宜超过 5℃。

### (五) 光照对蚤生长、发育的影响

Buikema<sup>[11]</sup> 研究了 9 种光照强度对蚤状蚤脱皮、生长和繁殖的影响,观察到在黑暗和光照强度 3.5lx 条件下,对 4 天幼蚤的平均体长无明显差别。光可影响第一次幼体释放之前的总时间,但光强不影响每个成体每胎的平均数,但明显地影响每胎的产卵数和每个成体的累计产卵数。母体产出的幼体在暗处生长 3 天,蚤的体长与对照组无差异。再将其移回正常光照下培养,能正常繁殖,这表明两龄前的幼体对光不敏感。培养时间相同,弱光 (1.5—3lx) 条件下蚤的龄数比强光 (800—1 000lx) 少(表 6),即蚤在弱光下脱

表 6 光照强度对大型蚤 HB 生长、发育的影响

Tab. 6 Effects of light intensity on the growth and development of *D. magna* HB

光强 <sup>①</sup>  培养时间 (天) <sup>②</sup>		1.5—3 lx			60—100 lx			800—1000 lx		
		分组 <sup>⑥</sup> 龄期 <sup>③</sup>	平均体长 <sup>④</sup> (mm)	平均产卵数 <sup>⑤</sup> (个)	分组 <sup>⑥</sup> 龄期 <sup>③</sup>	平均体长 <sup>④</sup> (mm)	平均产卵数 <sup>⑤</sup> (个)	分组 <sup>⑥</sup> 龄期 <sup>③</sup>	平均体长 <sup>④</sup> (mm)	平均产卵数 <sup>⑤</sup> (个)
7		3—4	1.86 ±0.226		5	2.18 ±0.188	0.7±0.58	5	2.22 ±0.178	1±0.1
17		7	2.93 ±0.240	7±6.63	9	2.95 ±0.029	9±7.07	9	3.17 ±0.253	19±7.0
26		10	3.55 ±0.279	25±5.29	12	3.57 ±0.098	17±7.21	12	3.76 ±0.217	22±5.13

① Light intensity; ② Culture time (day); ③ Stadium of instar; ④ Mean length±S. D. ⑤ Mean number of egg/indiv±S.D. ⑥ groups

皮时间延长。试验表明,蚤培养在弱光下性成熟迟,培养 17 天,光强 1.5—3 lx 蚤的平均产卵数比 800—1 000 lx 的明显的少。

### (六) 冬卵的产生因素

当环境条件恶化时,蚤的代谢速率降低,蚤将出现雄体,进行有性繁殖,产生冬卵。温度在 20℃ 以下时,蚤的种群密度过大,食物不足及培养液较长时间不更换,均易促成蚤的有性繁殖。从表 7 可知,在 15℃ 时种群密度大的蚤所产冬卵数多,长期食物不足时,无论换水与否,所产冬卵均多,而食物充足组换水与不换水的均无冬卵。室内连续培养 3 年的大型蚤也未出现冬卵,并且在上述不同温度下大型蚤 HB 的生长、繁殖规律和不同光照强度对大型蚤生长、发育的试验中(食物都充足),也未观察到冬卵。这些都表明了食物不足是产生冬卵的主要因素。在 25℃—31℃ 当食物不足和水质差时,蚤出现死亡,未观察到冬卵。在 20—22℃ 当种群密度过大,食物不足时观察到大量雄体出现,特别是 4 龄蚤因缺食必然出现雄体。

表 7 种群密度、水质和食物对蚤冬卵形成的影响(15℃)

Tab. 7 Effects of food, water quality and population density on the formation of resting eggs in *D. magna* HB

蚤密度个/ml 水 Population density	水质状况 Water quality	饵料状况 Feeding condition	冬卵数(个) Number of resting eggs
1/10	定期换水	食物充足	0
	长期不换水	食物充足	0
1/16.7	定期换水	4 龄时不喂	1
	长期不换水	同上	2
1/6.7	定期换水	同上	5
	长期不换水	同上	9
1/10.5	长期不换水	长期食物不足	17
1/13.5	定期换水	同上	15

排放冬卵后的成体如果每天以充足的食物培养,仍能恢复孤雌生殖。但有时每次产卵后的间歇时间无规律,甚至要间歇几龄后再次产卵。

### (七) 大型蚤 HB 对重铬酸钾的敏感性

为核对试验的操作方法和观察试验生物是否正常,国际标准法组织曾组织了 46 家实验室测定大型蚤对重铬酸钾等标准毒物的敏感性。其中对重铬酸钾的 24h  $EC_{50}$  的范围为 0.90—2mg/L。我们培育的大型蚤 HB(按国际标准法 ISO 6341)<sup>[13]</sup> 进行对重铬酸钾的敏感性测定,10 次的平均值,24h  $EC_{50}$  为 0.92mg/L,符合国际标准法的试验动物。

### 参 考 文 献

- [1] 宋大祥,1962.大型蚤 (*Daphnia magna* straus) 的初步培养研究.动物学报,14(1): 49—62.
- [2] 庄德辉、梁彦龄,1986.大型蚤生长、生殖和种群增长的研究.水生生物学报,10(1): 24—30.
- [3] B. 罗特、张甬元,1987.试验用大型蚤 (*Daphnia magna*) 的培养方法.环境科学,8(3): 28—30.

- [4] 孙美娟等, 1982. 六六六在水环境中转移、积累和归趋研究 2. 斜生栅藻和裸腹溞对六六六的积累. 水生生物学集刊, 7(4): 527—531.
- [5] 黄祥飞, 1984. 温度对透明溞和隆线溞-亚种发育及生长的影响. 水生生物学集刊, 8(2): 207—224.
- [6] 郑重, 1953. 温度对于淡水枝角水蚤 (*Daphnia pulex*) 生殖的影响, 厦门大学学报(数学生物版): (2): 29—36.
- [7] 郑重, 1954. 温度对于淡水枝角水蚤生长的影响. 厦门大学学报(自然科学版), (4): 83—90.
- [8] 蒋燮治、堵南山编著, 1979. 中国动物志节肢动物门甲壳纲, 淡水枝角类. 科学出版社.
- [9] 大连水产学院, 1982. 淡水生物学. 农业出版社.
- [10] Anderson, B. G. & Jenkins, J. C., 1942. A time study of events in the life span of *Daphnia magna*. *Biol. Bull.*, 83: 260—272.
- [11] Buikema, A. J. JR., 1973. Some effect of light on the growth, molting, reproduction and survival of the cladoceran, *Daphnia pulex*. *Hydrobiologia.*, 41(3): 391—418.
- [12] Green, J., 1954. Size and reproduction in *Daphnia magna* (Crustacea: cladocera). *Pro. Zood. Soc. Lond.*, 124: 535—545.
- [13] ISO 6341, 1982. Water quality-determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* straus (*Cladocera*, crustacea). First edition, Switzerland.
- [14] Ten Berge, W. F. 1978. Breeding *Daphnia magna*. *Hydrobiologia.*, 59(2): 121—123.
- [15] Vijverberg, J. 1976. The effect of food quantity and quality on the growth birth-rate and longevity of *Daphnia Hyalina* Leydig. *Hydrobiologia.*, 51(2): 99—108.

## PRELIMINARY STUDY OF BREEDING AND BIOLOGY OF *DAPHNIA MAGNA* HB, A HIGH-TEMPERATURE- RESISTANT SPECIES

Sun Meijuan   Zhang Yongyuan   and   Cai Junpeng

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan 430072)

### Abstract

This study investigated the effects of population density, food, temperature and light intensity on the growth and reproduction of *D. magna* HB, collected in summer in fish ponds in Wuhan, as well as the methods of breeding and strain maintenance. Results from three years continuous breeding in the laboratory showed that *D. magna* HB grew and reproduced normally between 15—31°C when fed fresh green algae. At 31°C, the maximum body length was 3.65 mm and the maximum number of eggs/brood was 26.

According to the method recommended by the ISO 6341, the susceptibility of *Daphnia magna* HB to the standard toxicant, potassium dichromate was determined, 24h EC<sub>50</sub> was 0.92 mg/L.

### Key words

*Daphnia magna* HB, Temperature-resistant, Breeding, Growth and reproduction