

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 EC₅₀ 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^[1-3, 14]。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。活性碳柱长 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)^[4]。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. 大型溞 HB 的纯系分离 在8月份从本所鱼池采捕的大型溞经室内驯养,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. 大型溞 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^[3],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,吸去溞皮和沉淀物。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. 大型溞 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次产出幼体为溞种,继续繁殖。

结果与讨论

(一) 不同温度下大型溞 HB 生长繁殖规律

1. 龄期和龄数 潙体被一壳所包裹,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。大型溞 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,大型溞 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 不同温度下大型溞 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 潙培养密度为1个/20ml,每级温度有溞10—20个;② 10龄后部分龄期更长些

表2 大型溞 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 潙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^[5]。大型溞 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^[6]。

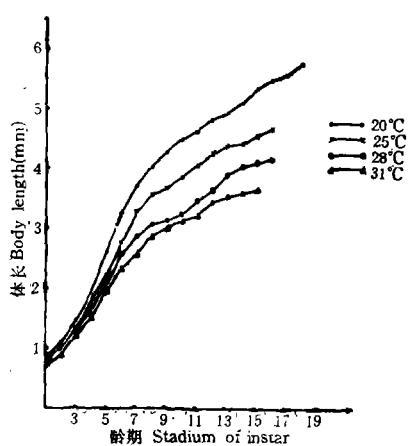


图 1 不同温度下大型溞 HB 体长的变化

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^[12]。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 大型溞 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 潜在适合的条件下进行孤雌生殖。在室温 18—23℃ 时, 大型溞的幼龄期不少于 5 龄^[13]。大型溞 HB 4 龄前未成熟者为幼体, 5 龄后以开始繁殖者为成体, 大型溞 HB 的产卵量在 25℃ 最高(图 2)。在同一温度下大型溞

HB 每胎最高产卵数和累计产卵数均比报道的高^[6](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 大型溞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 ^[11]
累计产卵数(个) Total number of eggs	306	447.3	162	62	本文
	276.6	146.3	—	—	宋大祥 ^[11]

大型溞正常生长、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^[9], 一个世代即告结束。而大型溞 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) 食物对大型溞生长、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^[14]。水溞

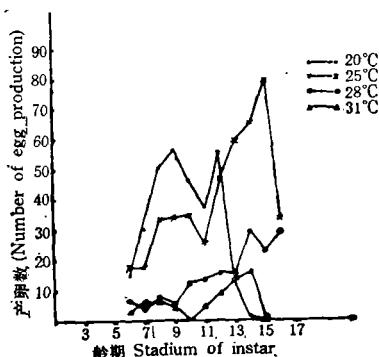


图 2 大型溞 HB 在不同温度下产卵数的变化

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

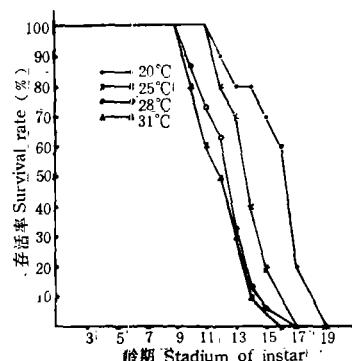


图 3 不同温度下大型溞 HB 存活率的变化

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

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

表 4 食物量对大型溞 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

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 mm	平均体长 3.58 \pm 0.12 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^[15]。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 水中方能保证大型溞的正常生长和发育^[16]。我们在 500ml 培养液中放入 50 个成体溞(6—7 龄), 培养液计数含栅藻细胞 200 万个/ml, 测得 OD₆₅₀ 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 OD₆₅₀ 为 0.05, 48h 后培养液绿色消失。由于溞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 个溞计, 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溞的生长也有影响。

(三) 种群密度对大型溞 HB 生长发育的影响

种群密度对其生长、繁殖有影响(表 5)。溞的培养密度一般为 1 个/20ml 较好, 潙的密度在 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,溞的培养密度为 1 个/10ml 是可行的。若溞密度过大,往往因食物不足和水质恶化而使溞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 的溞性成熟迟,且个体小,产卵量少,个别排出未成熟卵和溞死亡率高。

表 5 不同溞密度下大型溞 HB 的生物学特性

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

溞密度 ^①	1 个/4ml			1 个/10ml			1 个/20ml		
	特性 ^②	平均体长 (mm)	平均产卵数(个) ^⑤	存活率 (%) ^⑥	平均体长 (mm) ^④	平均产卵数(个) ^⑤	存活率 (%) ^⑥	平均体长 (mm) ^④	平均产卵数(个) ^⑤
龄期 ^③									
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) 温度变化对大型溞生长、发育的影响

温度对溞生长、发育的影响,国内外已有许多研究^[1,5-7,14]。但在室内培养中温度变化对溞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),但溞仍然按时脱皮。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℃,则溞体发育慢,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。成体溞最大体长仅 3.74mm。存活时间只少数达 19 龄。

为使 20℃ 培养的大型溞 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

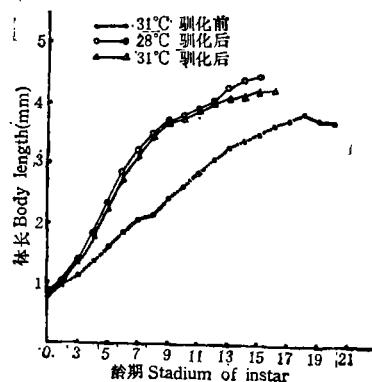


图4 高温驯化前后大型蚤 HB 体长的变化
Fig. 4 Changes in body length of *D. magna* HB before and after acclimation to high temperatures

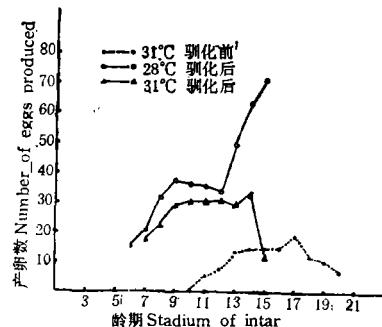


图5 高温驯化前后大型蚤 HB 产卵数的变化
Fig. 5 Changes in the number of eggs produced by *D. magna* HB before and after acclimation to high temperatures

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°C。

(五) 光照对蚤生长、发育的影响

Buikema^[11] 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 ^①	1.5—3 lx			60—100 lx			800—1000 lx			
	培养时间 ^② (天)	分组 ^③	龄期 ^④	平均体长 ^⑤ (mm)	平均产卵数 ^⑥ (个)	龄期 ^④	平均体长 ^⑤ (mm)	平均产卵数 ^⑥ (个)	龄期 ^④	平均体长 ^⑤ (mm)
	7	3—4	1.86 ±0.226			5	2.18 ±0.188	0.7±0.58	5	2.22 ±0.178
	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 grouns

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 EC₅₀ 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)^[13] 进行对重铬酸钾的敏感性测定,10 次的平均值,24h EC₅₀ 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. 斜生栅藻和裸腹蚤对六六六的积累。水生生物学集刊,7(4): 527—531。
- [5] 黄祥飞,1984。温度对透明蚤和隆线蚤-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., 1947. 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). *Proc. Zool. 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 EC₅₀ was 0.92 mg/L.

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