

冷冻对轮虫休眠卵上浮率的影响

金送笛 李永函

(大连水产学院, 116024)

摘 要 本文报道了冷冻对轮虫休眠卵在水中上浮率的影响。一次冷冻(24小时)可使各种轮虫休眠卵在水中的上浮率平均提高近50%,使晶囊轮虫休眠卵的上浮率提高90%左右。多次反复冷冻能使各种轮虫休眠卵的上浮率提高85%左右。冷冻时间在8~104小时间,延长冷冻时间不会影响轮虫休眠卵的上浮率,并分析了冷冻处理后的休眠卵在水中和糖盐高渗液中上浮率提高的机理,讨论了冷冻处理在轮虫休眠卵浮选、定量以及土池轮虫生产中的意义。

关键词 轮虫,休眠卵,冷冻,上浮率

准确地定量水体中的轮虫休眠卵,有助于池塘轮虫的大量培养。天然水体中轮虫所产休眠卵,通常沉积水底、混杂于泥沙之中,给定量工作带来很大困难。为此,国内外学者做了许多工作^[1,5~7],但效果并不理想,特别是对于那些结构较特殊的晶囊轮虫(*Asplanchna. sp.*)、三肢轮虫(*Filinia. sp.*)等的休眠卵,迄今尚未找到一个合适的定量、浮选办法。

近年在轮虫的室外土池增殖过程中发现,我国北方一些经冻底的鱼池,轮虫种群出现早、生物量大。这表明,冷冻与轮虫休眠卵的分布和萌发,可能存在某种关系。为此,围绕冷冻与轮虫休眠卵的上浮问题,我们进行了一系列试验研究。

材 料 与 方 法

(一)采样

试验用含轮虫休眠卵泥样,均用李永函等^[1]设计的柱形采泥器分别采自大连明泽湖和南关岭鱼场1#鱼池,除分层取样外都是采取5厘米左右表层泥样。将所采泥样充分搅匀后,用电子秤称取若干份(每份2克),分别置于50毫升玻璃锥形瓶中。

(二)上浮率实验

1. 未冻加水 于含泥样的锥形瓶中,加满自来水,反复搅动后静置10分钟左右,用粘取法反复粘取上浮卵计数。如此操作5~7次,直至不再有卵上浮时止,所得总卵数为未冻时休眠卵在水中的上浮卵量。吸出上清液。

收稿日期:1994-09-28。

•本项目为农业部85重点科研项目。

2. 冷冻后加水 将所剩泥浆水全部转移到小塑料瓶中置-18℃水箱中冷冻(时间与次数随观测项目而变)。取出在室温(25~28℃)下解冻后,全部转移至50毫升锥形瓶中,反复搅动、粘取上浮卵至不再有卵上浮为止,所得累计卵数即为冷冻后休眠卵在水中增加的上浮卵量。

3. 冻后加糖盐高渗液 再次吸出上清液后加入糖盐高渗液^[1],再按多次搅动、反复粘取的方法取出上浮休眠卵至不再有卵上浮止,所得累计卵数为冷冻加高渗液后所增加的上浮休眠卵量。

经上述处理后的沉积物在低倍显微镜下观察,除见一些轮虫空卵壳外,极少有完整的卵粒。故本试验将以上三种方式(未冻+水、冷冻后+水和冻后+糖盐高渗液)所浮选出的累计卵数视为该泥样中的总卵量,并以此作基数计算各方法所获卵量的上浮率。

在进行冷冻前后几种轮虫休眠卵在不同溶液中的上浮试验时,把试验样本均分为4组,每组设平行样3份。其中两组未经冰冻分别加入自来水和糖盐高渗液;另两组置-18℃冰箱中冷冻24小时,取出解冻后再分别加自来水和糖盐高渗液,上浮卵粘取方法同前。因为冷冻后加高渗液组休眠卵上浮量最高,且取其部分沉积物镜检,未发现完整的休眠卵,所以便以此为基数(100%)计算各组的上浮率。

结 果

(一)冷冻对不同轮虫休眠卵在不同溶液中上浮率的影响

图1说明,冷冻可提高轮虫休眠卵在自来水和糖盐高渗液中的上浮率,平均提高了50%以上。其中晶囊轮虫卵的上浮率提高最大(90%上下);三肢轮虫卵次之(在自来水中提高了56%,在高渗液中提高了约90%);角突臂尾轮虫卵的上浮率提高较小(约40%左右);蓼花臂尾轮虫卵冷冻前后在高渗液中的上浮率差别不大(均在90%以上)。

(二)冷冻时间对轮虫休眠卵上浮率的影响

由表1可见,冷冻1小时的泥样,休眠卵在自来水中所增加的上浮率小于5%,远远低于冷冻8小时以上的其余各组(平均增加近50%)。由方差分析表明,冷冻时间达8、32、56、80、104小时的各组间,休眠卵在自来水和高渗液中的上浮率差异均不显著($F_1 < F_{0.05(4,5)}$, $F_2 < F_{0.05(4,5)}$)

表1 冷冻时间对轮虫休眠卵上浮率的影响

Table 1 The effect of freezing time on floatation rate of resting eggs of Rotifers

组别 Groups	未 冻 Before freezing	冷 冻 后 After freezing		
	在水中的平均上浮率(%) Average floatation rate in the water(%)	时间(h) Time	在水中增加的平均上浮率(%) Increasing average floatation rate in the water(%)	加高渗液后增加的平均上浮率(%) Increasing average floatation rate after adding highpermeable solution(%)
1	3.21±0.05	1	4.05±0.57	92.75±0.51
2	8.70±0.57	8	50.35±0.59	40.96±0.02
3	8.92±0.99	32	51.82±1.10	39.27±0.10
4	7.46±1.72	56	45.77±5.79	46.79±4.08
5	9.21±1.39	80	49.86±7.49	41.33±5.55
6	8.47±0.98	104	45.94±2.86	45.60±1.89

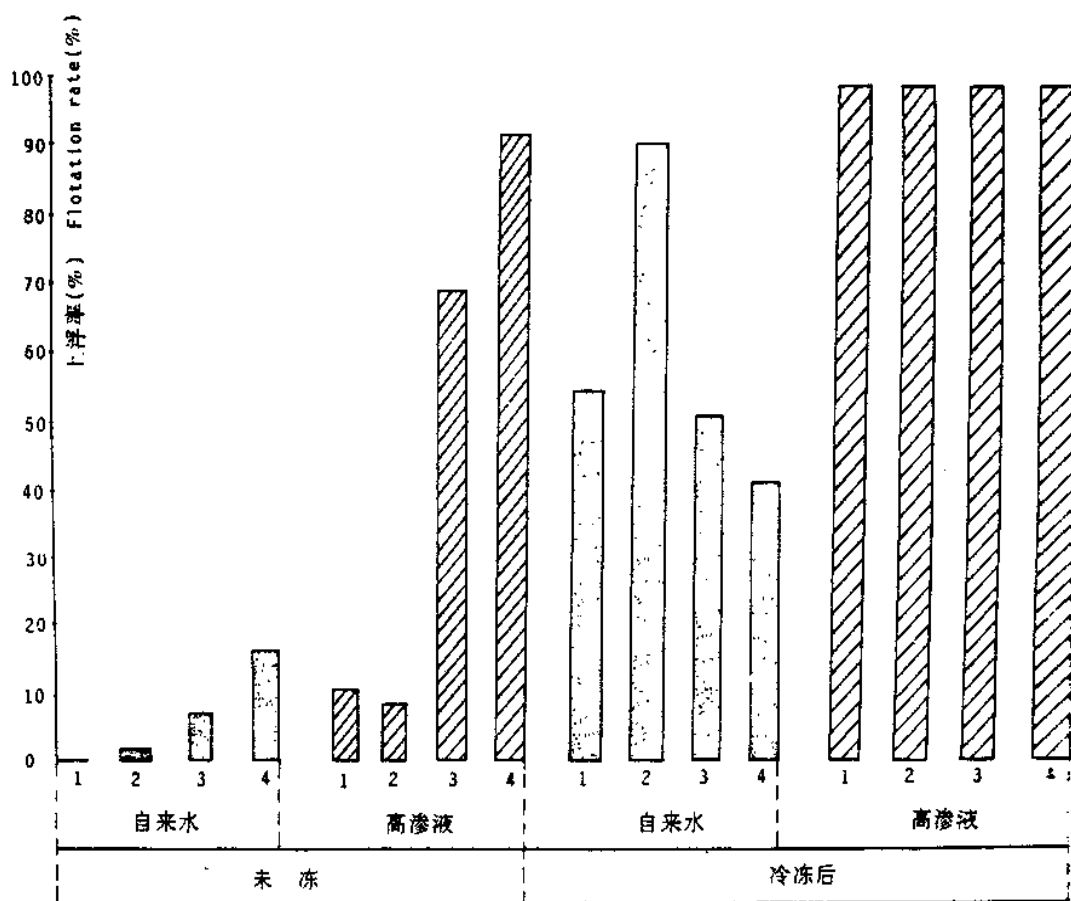
方差分析

Mean square deviation analysis

$F_{0.05(4,5)} = 5.19$

$F_1 = 0.75$

$F_2 = 2.04$



1. 三肢轮虫休眠卵 Resting egg of *Filinia*. sp. 2. 晶囊轮虫休眠卵 The resting egg of *Asplanchna*. sp.
 3. 角突臂尾轮虫休眠卵 Resting egg of *Brachionus angularis*
 4. 蓼花臂尾轮虫休眠卵 The resting egg of *Brachionus caryciflorus*

图 1 冷冻前后几种轮虫休眠卵在不同溶液中的上浮率

Fig. 1 The flotation rate of the resting eggs of several species of rotifers in the different solution after freezing

(三) 冷冻次数对不同种轮虫休眠卵上浮率的影响

图 2 分别列出一一次冷冻(24 小时)和多次(6~8 次)反复冷冻后各种轮虫休眠卵在水和高渗液中的上浮率。从图中可见,冷冻(无论一次或多次)能提高各种轮虫休眠卵在水中的上浮率。其中一次冷冻能使各种轮虫休眠卵的平均上浮率提高近 50%;多次反复冷冻平均上浮率则提高了 85%左右。但冷冻次数对不同种轮虫休眠卵上浮率的影响是不一样的。经一次冷冻后,角突臂尾轮虫和蓼花臂尾轮虫休眠卵在水中的上浮率仅提高 20~30%左右,三肢轮虫卵提高约 50%;唯晶囊轮虫休眠卵在一次性冷冻后已大部分(90%)上浮。多次冷冻对提高角突臂尾轮虫和蓼花臂尾轮虫休眠卵的上浮率效果最为显著。

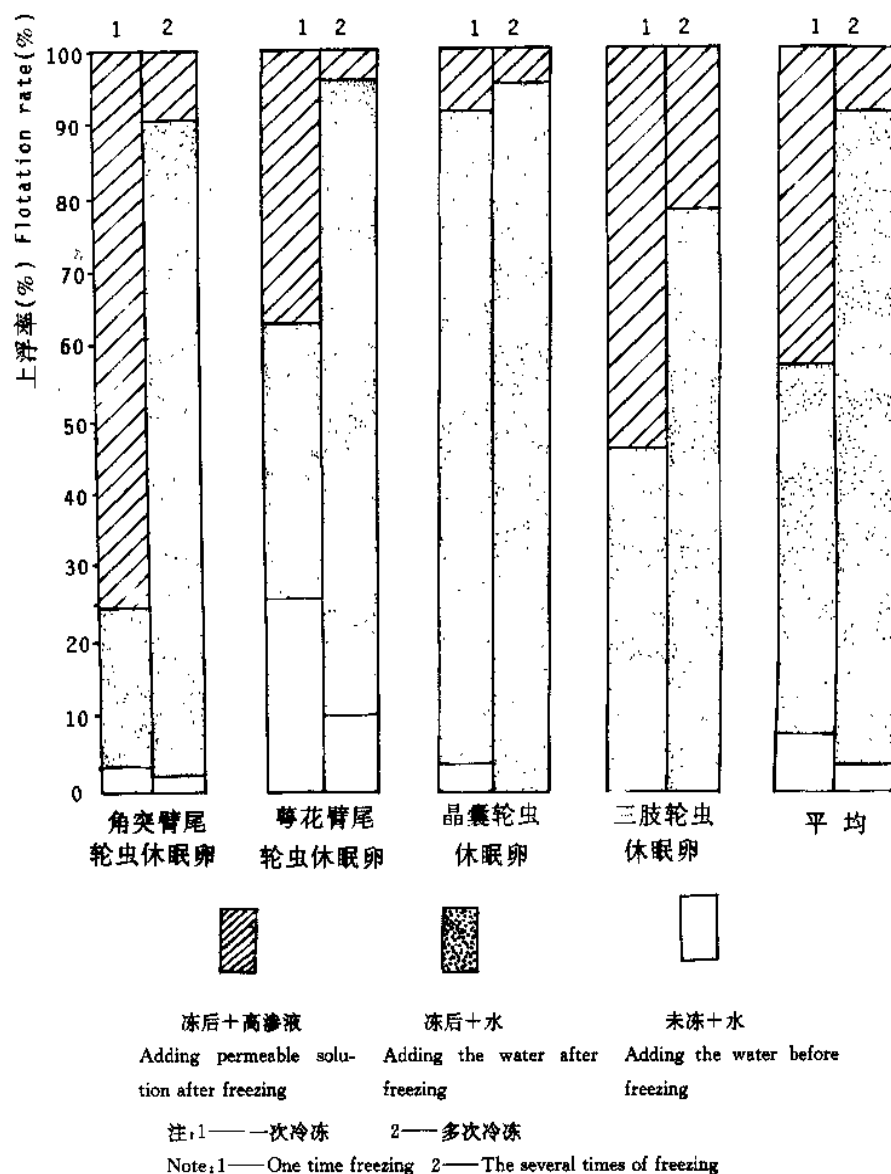


图2 冷冻次数对不同轮虫休眠卵上浮率的影响

Fig. 2 The effect of freezing frequency on flotation rate of the resting eggs of different rotifers

(四) 冷冻对不同深度泥层中轮虫休眠卵上浮率的影响

从表2可见,未冻轮虫休眠卵在水中的上浮率随泥层深度的增加而递增,二者直线正相关($r=0.96$ $n=5$);冷冻处理后轮虫休眠卵在水中所增加的上浮率则随泥层深度增加而递减,二者直线负相关($r=-0.94$ $n=5$)。由表2还看出,较深层泥样($>15\text{cm}$)中的休眠卵,冷冻后在水中的上浮率提高不甚明显。

表 2 冷冻对不同深度泥层中轮虫休眠卵上浮率的影响

Table 2 The effect of freezing on floatation rate of the resting eggs of Rotifers in the different depth of the sediments layers

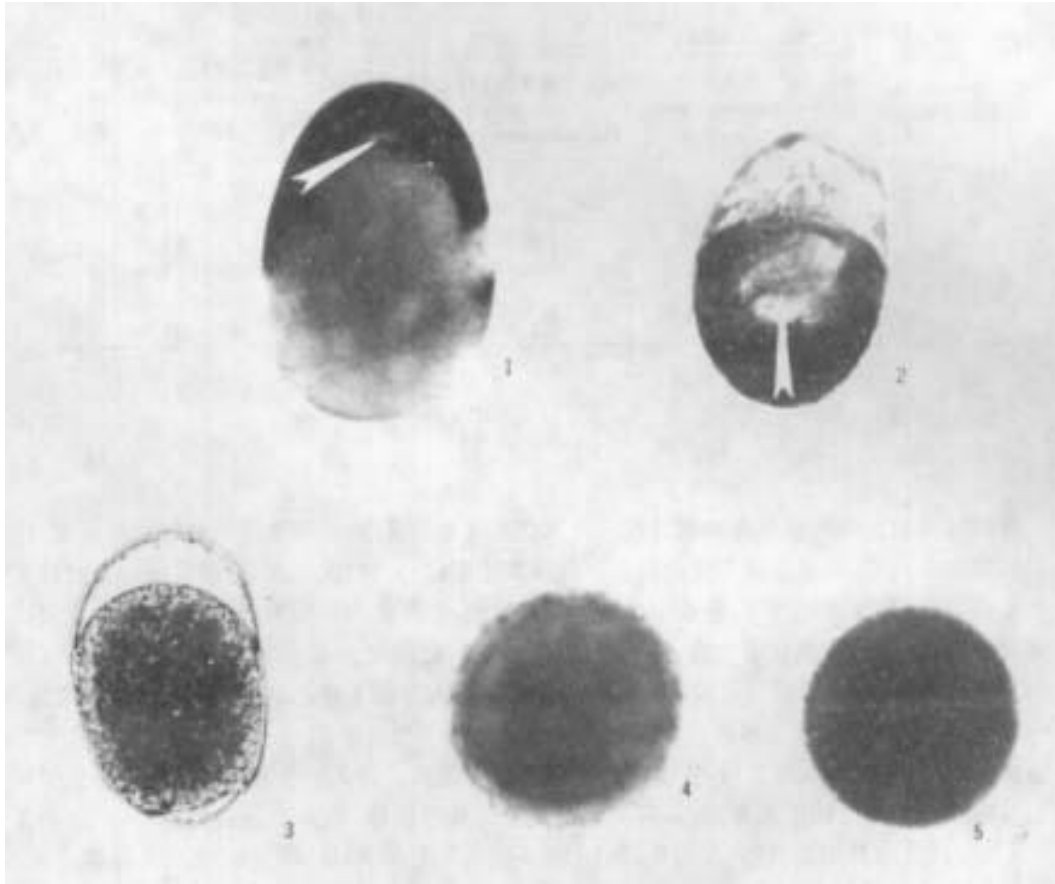
泥层深度 (cm) The depth of the sediment layers	未 冻 Before freezing	冷 冻 后 After freezing	
	在水中的平均上浮率(%) Average floatation rate in the water(%)	在水中增加的平均上浮率(%) Increasing average floatation rate in the water(%)	加高渗液后增加的平均上浮率(%) Increasing average floatation rate after adding high permeable solution(%)
0	8.16±0.46	40.62±6.89	51.22±7.35
5	8.76±0.16	36.49±3.51	54.75±3.68
10	29.78±3.13	31.58±1.03	38.64±2.91
15	35.05±9.16	25.54±5.40	39.41±3.68
20	43.28±4.80	7.21±0.76	49.51±4.04

讨 论

1. 冷冻提高轮虫休眠卵上浮率的机理 物体在液体中的沉浮,主要取决于该物体的重量、体积和液体的比重。由原生质构成的轮虫休眠卵其比重(>1.04)大于水,因而从母体产出后沉积水底。若将其冷冻,由于细胞液中水分的反常膨胀,使卵的体积增大,解冻升温后细胞质收缩复原,而坚硬的卵壳收缩性差,属不可逆变化,二者之间便出现一个充气空隙(图版—1),由于卵的体积增大、形成气室,浮力增大,经搅动后便有可能上浮。其上浮率与卵体积膨胀、形成气室大小有关。反复多次冷冻有助于休眠卵体积和气室的扩大。所以,本试验的几种轮虫休眠卵经多次冷冻、解冻后,在水中的上浮率显著提高。表2中未冻轮虫休眠卵在水中的上浮率随泥层深度的增加而递增,其原因是表层泥样中的休眠卵,多是当年新产的卵(采自8月份),尚未自然形成气室,在水中难以上浮。而较深泥层中的休眠卵,均是隔年或多年的,在其代谢或冬季自然冷冻过程中,许多卵已形成气室,经搅动就易上浮。表2中较深层($>15\text{cm}$)泥样中的轮虫休眠卵,经冷冻后上浮率提高不甚明显,可能与年长日久,卵壳软化(细菌等分泌酶类水解壳中物质使其变软),冻和解冻过程中卵壳与原生质同步胀缩,不能增大卵的体积、难以形成气室有关。

轮虫休眠卵在糖盐高渗液中上浮的基本原理,一是由于高渗液比自来水密度大,上浮力大;二是在高渗环境中产生的渗透作用,使质膜内水分外渗,卵重量减小,原生质(包括胚胎)迅速收缩并与收缩性差的卵壳间出现一个气室(图版—2),有气室的休眠卵浮力增大而迅速上浮。实验表明,当把在高渗液中已形成气室的卵置清水中后,原生质很快吸水复原,气室随之消失(图版—3),卵重新下沉。ELIZABETH 等认为,臂尾轮虫休眠卵壳的最外两层对溶质起屏障作用^[8],即卵壳系一半透膜。这一过程酷似植物细胞在高渗液中所产生的质壁分离和复原现象。

本试验结果还表明,几种轮虫休眠卵经冷冻后在水中上浮率提高的幅度存在差异(图1),晶囊轮虫、三肢轮虫休眠卵明显高于两种臂尾轮虫休眠卵的上浮率。这和它们的结构有关,晶囊轮虫和三肢轮虫休眠卵,其卵膜外侧附有泡状装饰物。超薄切片电镜观察表明,晶囊轮虫休眠卵壳由三层组成,泡状装饰物为第一层,其内为致密的第二层^[2,4,8]。Mrazek^[8]认



说明:

1. 冷冻后上浮的臂尾轮虫休眠卵 $\times 300$ The floatating resting egg of Brachionus after freezing (with a gas chamber)
2. 加高渗液后上浮的臂尾轮虫休眠卵 $\times 300$ (示气室) The floatating resting egg of Brachionus after adding high permeable solution (show a gas chamber)
3. 无气室的臂尾轮虫休眠卵 $\times 300$ The resting egg of Brachionus of no gas chamber
4. 冷冻后的晶囊轮虫休眠卵 $\times 200$ (示最外层膨胀了的泡状结构) The floatating resting egg of Asplanchna after freezing (show expensing porous structure of the outer shell layer)
5. 未冻的晶囊轮虫休眠卵 $\times 200$ The resting egg of Asplanchna before freezing

* 图版照片由张东升同志提供,冷云曾参加此项工作,在此一并致谢。

为,这第二层是不透性的保护层(和前述臂尾轮虫的半透膜卵壳有重要区别),它有效地阻止了卵的“质壁分离”,故加高渗液后并不像臂尾轮虫休眠卵那样呈现大气室。而只有当冷冻使整个卵和外层泡状结构膨胀增大体积(图版—4)后才有可能上浮。我们实测了冷冻后上浮的 87 粒晶囊轮虫休眠卵的平均直径为 $163.86 \pm 16.68 \mu\text{m}$,同时测定了冷冻前沉于水底的 93 粒卵的平均直径为 $153.52 \pm 8.40 \mu\text{m}$,经 t 检验得 $t=5.303, t > t_{0.01(80)}, p < 0.01$ 。可见,冰冻前、后体积差异非常显著,即冰冻后晶囊轮虫休眠卵的体积显著大于未冻时的体积。

2. 冷冻处理在水体沉积物轮虫休眠卵定量中的应用 水体沉积物中轮虫休眠卵量的多寡,直接影响轮虫种群生物量的大小,较准确地定量单位体积沉积物中的卵量,是选择室外轮虫培育池首要和必需的手段。为解决这一问题,伊藤隆^[5]和 NipKOW^[6]采用了“直接计数法”May^[9]采用了“萌发法”李永函等^[1]采用了糖盐高渗液浮选法。“直接计数法”很难排除泥沙杂物的干扰,且工作量巨大;“萌发法”无法计数尚未终止休眠的新产休眠卵的数量,且很难创造全部卵萌发所需的条件,操作也十分繁琐。以上两种方法都不可能从沉积物中分离出轮虫休眠卵以供生产和试验用。李永函等的“高渗液法”确实为轮虫休眠卵的定量和浮选提供了一个切实可行的办法。但从本试验结果看,这种方法主要实用于臂尾轮虫属休眠卵的定量,而很难将晶囊轮虫和三肢轮虫这类结构特殊的休眠卵从沉积物中分离出来。晶囊轮虫是肉食性动物,它的存在必然妨碍其它轮虫的增殖;三肢轮虫在用做饲料生产上又存在诸多弊端。所以,定量并了解二者休眠卵的分布状况十分必要。本试验用冷冻方法顺利地解决了晶囊轮虫、三肢轮虫休眠卵的定量问题,为室外土池培养轮虫定向利用和控制晶囊轮虫提供了依据。

3. 冷冻处理在室外土池轮虫生产中的应用 沉积物中的轮虫休眠卵是室外土池增殖轮虫的内源性物质基础,但通常情况下,它们是不会上浮的。这类沉性卵因受环境条件(光照、氧气、水温等)的限制而难以萌发,李永函^[3]等用搅动底泥的办法,可促使一些已自然形成足够大气室的休眠卵上浮,在一定程度上提高了卵的萌发率,可是对于那些产出不久、尚未形成气室或气室很小的休眠卵,则不能使其上浮。本试验结果表明,用冻底泥的办法可以有效地提高它的上浮率,并有试验证明,这些经冷冻的上浮卵仍具活力^[10],且萌发速率更快。因此,在我国较高纬度地区,可以将选定的轮虫培育池,实行冬季排水冻池。对于春季注水不方便的池塘则可保存适当水位令其冻透。本试验表明(表 1),只要冷冻时间大于 8 小时即可达到提高上浮率的目的。所以对于那些冰期极短或冬季仍需保水越冬的鱼池,也可在翌年早春临时排干水,冻底几天即可获得同样效果。鉴于晶囊轮虫和三肢轮虫休眠卵在水中的自然(搅动)上浮率极低以及冷冻对它们的特殊“促浮作用”,对于那些臂尾轮虫休眠卵特别多的“老池塘”,可不予“冻底”,而只要反复搅动底泥,就可达到既增殖所需的臂尾轮虫又减少晶囊轮虫、三肢轮虫大量繁殖而可能带来的不利。对于某些以培养晶囊轮虫为目的的池塘,则尽可以放水冷冻以促进沉积物中的休眠卵上浮和萌发。

参 考 文 献

- [1] 李永函等,1985,养鱼池轮虫休眠卵分布和萌发的研究。水生生物学报,9(1):20~30。
- [2] 李永函等,1991,池塘习见轮虫休眠卵的形态和鉴定。大连水产学院学报,6(1):1~9。
- [3] 李永函等,1978,关于鱼苗下塘时池水水质生物指标问题的探讨。淡水渔业,(1):13~19。
- [4] 翟宝香、李永函,1987,用电镜对两种轮虫休眠卵卵膜的初步观察。大连水产学院学报,(1):19~27。
- [5] 伊藤隆,1958,养鳊池の水変り心に関する研究 X 养鳊池底泥上における轮虫类的越冬耐久卵の分布密度。Report of

- Faculty of Fisheries, Prefectural University of Mie, 3(1), 170~177.
- [6] Nipkow E. 1961. Die Radertiere in plankton des zurichsees und ihre Entwicklungsphasen. Schweiz. z. Hydrologie, 23, 398~461.
- [7] Pouriot, R. & Snell, T, 1983. Resting eggs in rotifers, Hydrobiologia, 104, 213~224.
- [8] Wurdak ET AL. 1978. Fine structure of the resting eggs of the rotifers *Brachionus calyciflorus* and *Asplanchna stebol-di*. Trans Amer. Micros. Soc, 97(1), 68.
- [9] May I. 1986. Rotifer sampling—a complete species list from one visit. Hydrobiologia, 134, 117~120.
- [10] Gilbert J. J., 1974. Dormancy in Rotifers. Trans. Amer. Micros. Soc, 93(4), 490.

EFFECT OF FREEZING ON FLOATATION RATE OF RESTING EGGS OF ROTIFERS IN THE WATER

Jing Songdi Li Yonghan

(Dalian Fisheries College, 116024)

ABSTRACT The effect of freezing on floatation rate of resting eggs of rotifers in the water was studied. The floatation rate of the resting eggs of rotifers by once freezing for 24 hrs in the water can be increased by nearly 50%, but that of *Asplanchna* is by about 90%. The floatation rate of the resting eggs of rotifers by freezing for many times in the water can be increased by about 85%.

The floatation rate of resting eggs of rotifers was not affected by freezing over 8—104h.

This paper deals with the mechanism of raising floatation rate of the resting eggs of rotifers after freezing treatments in the water and high permeable solution of sugar-salt and the significance of freezing treatments in the floating selection, quantification and production of rotifers in ponds.

KEYWORDS Rotifers, Resting eggs, Freeze, Floatation rate