

文章编号:1005-8737(2000)04-0122-03

·研究简报·

两种消毒剂处理对萼花臂尾轮虫休眠卵萌发的影响

Effect of treatments with 2 types of disinfectants on
the hatching of resting eggs of freshwater rotifer, *Brachionus calyciflorus*

席贻龙^{1,2}, 黄祥飞¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072; 2. 安徽师范大学生命科学院, 安徽 芜湖 241000)

XI Yi-long^{1,2}, HUANG Xiang-fei¹

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;

2. College of Life Science, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China)

关键词: 消毒剂; 萼花臂尾轮虫; 休眠卵; 萌发

Key words: disinfectant; *Brachionus calyciflorus*; resting egg; hatching

中图分类号: Q959.223; R979.7

文献标识码: A

在特定条件下形成的轮虫休眠卵, 经过一定时间的储藏保存, 其萌发率均有不同程度的降低^[1,2]。已有研究表明, 大量的细菌污染是导致褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*)休眠卵萌发率降低的主要因素之一; 使用适宜种类和浓度的消毒剂处理可显著地提高其萌发率^[3]。有关淡水轮虫休眠卵的报道较少, 为此我们使用扫描电子显微镜对萼花臂尾轮虫(*Brachionus calyciflorus*)休眠卵进行观察, 并用不同种类和浓度的消毒剂对其进行消毒实验, 旨在为轮虫休眠卵的有效保存和使用提供依据。

1 材料和方法

1.1 轮虫休眠卵

由实验室内培养产生。培养温度 25℃, 饵料为 HB-4 培养基培养的、处于指数增长期的斜生栅藻。所得休眠卵于 5℃ 冰箱内密封保存 2 个月用于萌发研究, 保存液为轮虫培养液(pH 7.3)^[4]。

1.2 消毒剂

实验用消毒剂次氯酸钙系 Sigma 公司产品(分析纯), 四环素由上海制药四厂生产。实验前用双蒸水将其配制成所需浓度, 待药品完全溶解后用于轮虫休眠卵的处理。

收稿日期: 2000-01-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870158)

作者简介: 席贻龙(1965-), 男, 安徽肥东人, 安徽师范大学教授、博士, 从事浮游动物生态研究。

1) 席贻龙, 黄祥飞. 不同培养条件下萼花臂尾轮虫所产休眠卵的萌发研究. 动物学报(待刊).

1.3 休眠卵的处理

次氯酸钙共设 4 个质量浓度梯度, 分别为 0.1、1.0、5.0 和 10.0 μg/ml; 四环素组亦设 4 个质量浓度梯度, 分别为 0.5、5.0、25.0 和 50.0 μg/ml, 将轮虫休眠卵分别浸泡于上述实验液中 1 h, 再用轮虫培养基反复冲洗 3 次后用于萌发实验。另设一未经消毒剂处理的休眠卵组作对照。

1.4 萌发实验

以特制的 24 孔、每孔容积约 3.5 ml 的有机玻璃培养皿为萌发容器, 每皿加入 2 ml 轮虫培养基作萌发液并放入 20 个休眠卵, 每组 6 个重复。实验过程中, 每日镜检 2 次并更换 1 次萌发液, 将孵出的轮虫幼体用玻璃微吸管吸出并计数。

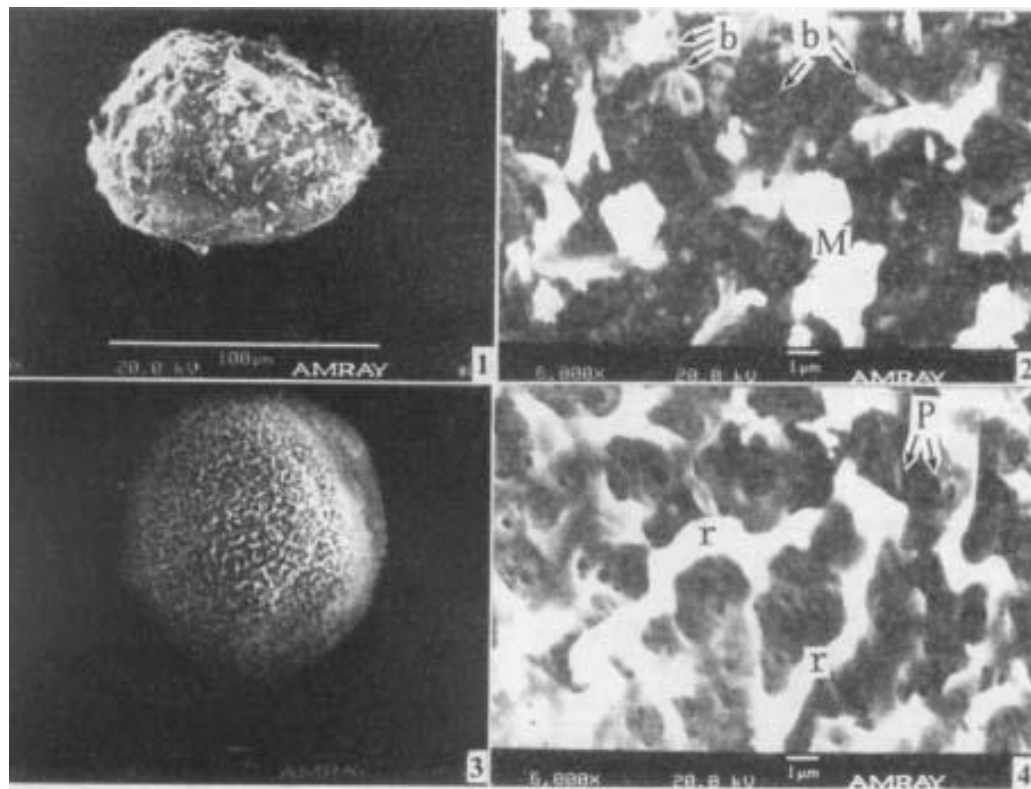
1.5 扫描电镜样品的制作

取经消毒剂处理和未经消毒剂处理的轮虫休眠卵若干个, 按席贻龙等^[5]方法进行样品制作, 然后在 AMRAY-1830 型扫描电镜上观察并摄影。

2 结果与分析

2.1 消毒剂处理对休眠卵表面附着物的影响

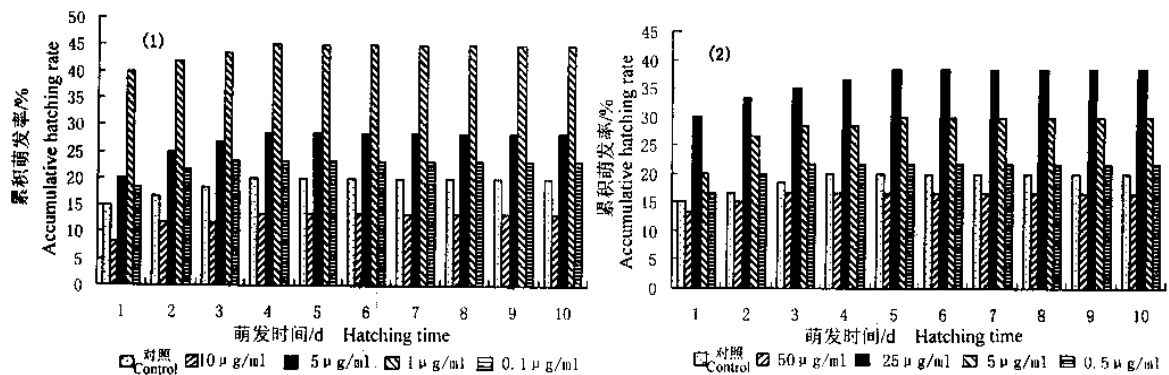
扫描电镜观察发现, 未经消毒剂处理的休眠卵表面常有大量的、呈粘液块状的附着物和众多附着的杆菌等。经消毒剂处理的休眠卵, 其表面相对较干净, 休眠卵表面所具有的嵴突状纹饰及微孔等结构清晰可见(图版 I)。



图版 I 轮虫休眠卵的扫描电镜观察

Plate I Scanning electronic micrograph of *Brachionus calyciflorus* resting egg

1. 被严重污染的休眠卵, $\times 500$ 。A heavily contaminated resting egg. 2. 被污染的休眠卵表面的粘液块状附着物(M)和杆菌(b), $\times 6000$ 。Mucous lumps (M) and bacillus (b) on the surface of a contaminated resting egg. 3. 经次氯酸钙处理的休眠卵的表面观, $\times 600$ 。Surface view of a resting egg treated with sodium hypochlorite. 4. 经次氯酸钙处理的休眠卵表面的嵴突(r)和微孔(P), $\times 6000$ 。Ridges (r) and minute pores (P) on the surface of a resting egg treated with sodium hypochlorite.



(1) 次氯酸钙处理 Treated with sodium hypochlorite (2) 四环素处理 Treated with tetracycline

图 1 不同种类和浓度的消毒剂处理后轮虫休眠卵的萌发动态

Fig.1 Hatching dynamics of resting eggs treated with different types and concentrations of disinfectants

2.2 消毒剂处理对休眠卵萌发的影响

2.2.1 休眠卵的萌发型式 图1为不同浓度的次氯酸钙和四环素处理后轮虫休眠卵的萌发情况。由图中可见,休眠卵中萌发个体大多在实验开始后的4 d内,少数在实验开始后的3 d或5 d内萌发;此后不再有休眠卵萌发。因此,和对照组相同,各组中休眠卵的萌发型式均为同步萌发型式。但不同的是,经质量浓度为1.0~5.0 $\mu\text{g/ml}$ 次氯酸钙处理的休眠卵的首发率(第1d内的累积萌发率)相对较高,四环素组次之,对照组最低。

2.2.2 休眠卵的累积萌发率 经处理后的轮虫休眠卵累积萌发率列于表1。和对照组相比,质量浓度为1.0 $\mu\text{g/ml}$ 和5.0 $\mu\text{g/ml}$ 的次氯酸钙处理能显著提高休眠卵的累积萌发率($P < 0.05$),其中以1.0 $\mu\text{g/ml}$ 组的累积萌发率最高;质量浓度为5.0 $\mu\text{g/ml}$ 和25.0 $\mu\text{g/ml}$ 的四环素处理也能显著地提高休眠卵的累积萌发率($P < 0.05$),其中5.0 $\mu\text{g/ml}$ 组的累积萌发率最高,且以1.0 $\mu\text{g/ml}$ 的次氯酸钙处理的轮虫休眠卵的累积萌发率显著高于以5.0 $\mu\text{g/ml}$ 四环素处理的轮虫休眠卵的累积萌发率($P < 0.05$)。

表1 不同种类和浓度的消毒剂处理后休眠卵的累积萌发率
Table 1 Accumulative hatching rate of resting eggs treated with different types and concentrations of disinfectants

分组 Group	消毒剂浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) Concentration of disinfectant	累积萌发率/% Accumulative hatching rate
对照组 Control	—	20.00 $\pm$ 4.32
次氯酸钙 Sodium hypochlorite	0.1	23.33 $\pm$ 8.16
	1.0	45.00 $\pm$ 8.37
	5.0	28.33 $\pm$ 4.08
	10.0	13.33 $\pm$ 5.16
四环素 Tetracycline	0.5	21.67 $\pm$ 4.08
	5.0	30.00 $\pm$ 6.32
	25.0	38.33 $\pm$ 7.53
	50.0	16.67 $\pm$ 5.16

3 讨论

(1) 轮虫培养过程中有害细菌的污染一直是影响轮虫种群稳定性的主要因素之一,有害细菌的污染还会导致鱼类等水产经济动物幼体的次级感染。因此如何去除有害细菌的污染是轮虫规模化培养过程中备受关注的问题之一^[6,7]。在轮虫休眠卵的规模化生产过程中,培养液中的细菌也会污染休眠卵,从而导致休眠卵的萌发率降低和鱼类等幼体的次级感染^[1]。目前已知,臂尾轮虫休眠卵具下沉特性,沉积于水体沉积物中,使氧气和光化学反应物质难以进入,从而导致其活力大幅度降低^[8]。而休眠卵表面的细菌可能正是通过阻塞卵表面的微孔,阻碍了氧气和光化学反应物质的进入,从而导致其萌发率的降低。适宜种类和浓度的消毒剂处

理有助于去除卵表面的细菌,提高休眠卵的萌发率。

(2)与 Balompapung 等^[3]的观察结果不同,本研究发现,被污染的休眠卵表面除了有杆菌附着,还有粘液块状附着物,其成分目前仍不清楚,但经过次氯酸钙处理后,粘液块状附着物也和杆菌一样被去除。众多的粘液块状物质附着于休眠卵的表面,很可能也对休眠卵的萌发产生不利的影响。

(3)四环素一直是有效的杀菌药物,在轮虫的规模化培养中已被成功地用于有害细菌群落的防治^[9]。Balompapung 等^[3]研究发现,使用四环素处理褶皱臂尾轮虫休眠卵并不能显著提高其萌发率,并认为这可能与四环素的用量较低(0.5 $\mu\text{g/ml}$)有关^[3]。本研究结果表明,质量浓度为5.0 $\mu\text{g/ml}$ 和25.0 $\mu\text{g/ml}$ 的四环素处理能显著提高休眠卵的累积萌发率。与四环素不同的是,次氯酸钙除了具有杀菌作用外,还是被广泛应用的脱壳剂^[3]。因此,使用适宜浓度的次氯酸钙处理休眠卵,不仅去除了卵表面污染的细菌,而且还会通过其氧化作用使卵壳结构发生变化,从而有利于卵的孵化。这可能也是次氯酸钙比四环素更能有效提高休眠卵萌发率,尤其是首发率的原因。

细菌污染是降低轮虫休眠卵萌发率的主要原因之一。如何采取有效措施以最大限度减少休眠卵生产和储存过程中细菌的污染,是轮虫休眠卵商品化生产的关键问题之一。

参考文献:

- [1] Balompapung M D, Hagiwara A, Nozaki Y, et al. Preservation of resting eggs of the euryhaline rotifer *Brachionus plicatilis* O F, Muller by canning[J]. *Hydrobiologia*, 1997, 358: 163-166.
- [2] 陈菊芳,周洁,黄祥飞. 萼花臂尾轮虫休眠卵萌发的研究[J]. *应用生态学报*, 1998, 9(1): 67-70.
- [3] Balompapung M D, A Hagiwara. Effect of disinfectants on the hatching of marine rotifer resting eggs of *Brachionus plicatilis* Muller[J]. *Aquaculture Research*, 1997b, 28: 559-565.
- [4] Gilbert J J. Mictic female production in rotifer *Brachionus calyciflorus*[J]. *J Exp Zool*, 1963, 153: 113-124.
- [5] 席贻龙,谈奇坤. 日本沼虾精子的形态和超微结构的研究. *水生生物学报*, 1997, 21(1): 59-63.
- [6] Perez B G, F J Gatesoup. Bacteria associated cultured rotifers and *Artemia* are detrimental to larval turbot, *Scophalmus maximus* L. [J]. *Aquacultural Engineering*, 1988, 7: 289-293.
- [7] Skjermo J, O Vadstein. Characterization of the bacteria flora of mass cultivated *Brachionus plicatilis* [J]. *Hydrobiologia*, 1993, 255/256: 185-191.
- [8] Hagiwara A, Hino A, R Hirano. Combined effects of environmental conditions on the hatching of fertilized eggs of the rotifer *Brachionus plicatilis* collected from an outdoor pond[J]. *Bull Jap Soc Fish*, 1985, 51(5): 755-758.
- [9] Tanasomwang W, W Muroga. Effects of sodium nifurstyrenate and tetracycline on the bacteria flora of rotifers (*Brachionus plicatilis*) [J]. *Fish Pathology*, 1989, 24: 29-35.