

中国卤虫卵孵化特性的研究*

杨 娜 卞伯仲 李明仁

(青岛海洋大学 应用微藻研究所)

提 要 本文对山东埭口盐场、海南岛莺歌海盐场及青海柯柯盐湖天然采集的卤虫卵进行了孵化特性研究。埭口、莺歌海及柯柯的虫卵壳厚分别为 9.7, 11.4 及 13.2 μm 。在放入海水中进行孵化前上述三品系的卤虫卵分别在自来水中浸泡 2, 3 及 4 小时能获得最佳孵化率。它们的最适孵化温度分别为 25.5~28.5 $^{\circ}\text{C}$, 27.0~30.0 $^{\circ}\text{C}$ 及 27.0~33.0 $^{\circ}\text{C}$ 。最适孵化盐度分别为 30, 20 及 35‰。孵化的同步性以“莺歌海”为最好, 为 6.4 小时, “埭口”次之, 为 6.5 小时, “柯柯”为 7.4 小时。

实验室内培养产卵后 24 小时内收集的虫卵用下列方法处理能终止虫卵的滞育状态: (1) 埭口卤虫卵: 浸泡于粗盐饱和溶液中 2~3 个月, 孵化率可达 91~94%。(2) 莺歌海卤虫卵: 浸泡于粗盐饱和溶液中 2~5 个月, 孵化率可达 80~91%。(3) 柯柯卤虫卵: 置于 5 $^{\circ}\text{C}$ 2~3 个月孵化率可达 96~98%。用 3% H_2O_2 及 3% 甲醛溶液处理对终止滞育状态没有作用。天然采集的三个品系的卤虫卵用 3% H_2O_2 或 3% 甲醛溶液或用去壳溶液处理均可以提高孵化率。

关键词 卤虫卵, 孵化率, 终止滞育法

卤虫的无节幼体是许多经济水产动物的重要初期饵料。孵化卤虫休眠卵(以下简称卤虫卵)已成为对虾、河蟹等工厂化育苗过程中极重要的一个环节。虽然卤虫卵的质量低下是造成孵化率低的主要原因之一, 但孵化过程中对环境因子控制的不当也能造成孵化失败。因此, 有必要探讨各种环境因子对孵化率的影响。

国外学者对一些常用卤虫品系的虫卵孵化最适盐度、温度、pH、光照等因子已有明确的定论^[22,23]。这些国外学者对我国卤虫卵的研究虽然产地标明是天津, 但事实上仅能表示是从天津出口的卤虫卵而产地并不明确。我国的卤虫分布很广, 从沿海的盐田、西北的盐湖、山西的盐湖直至青藏高原上的某些盐湖, 均有卤虫的分布^{[1,4](1)(2)}。而目前仅有蒋德春(1985)⁽³⁾报导了盐度对山东羊口盐场卤虫卵孵化的影响, 以及赵乃刚(1980)报导了影响天津塘沽盐场卤虫卵的孵化率的一些因子, 而其他产地的卤虫卵的孵化特性则未见报导。因此本文选择了栖息环境差异较大的三个卤虫品系——山东埭口盐场(渤海湾海盐区), 海南岛莺歌海盐场(热带海盐区)及青海柯柯盐湖(西北高原盐湖区)的卤虫卵做为试验材料, 探讨了这三个地区天然采集卤虫卵的最佳孵化条件。目的是从这些最佳孵

* 本文由国家自然科学基金 3860800 项目资助(1987)

收稿年月: 1988 年 11 月; 1989 年 5 月修改。

- (1) 卞伯仲, 李明仁, 1989. 我国不同产地卤虫(*Artemia parthenogenetica*)的卵生/卵胎生比率观察简报. 中国水产学会 1987 年学术年会论文集。
- (2) 李明仁等, 1989. 山东盐田及新疆盐湖卤虫(*Artemia parthenogenetica*)生物学测定值的比较. 中国水产学会 1987 年学术年会论文集。
- (3) 蒋德春, 1985. 盐度对卤虫休眠卵孵化影响的研究. 鲁盐科技, (4): 33~37.

化参数来比较三个卤虫品系间的差异,并且将这些参数用于终止滞育方法的研究。

卤虫是生长在高盐水域中的低等甲壳动物。它具有的特殊的生态适应机制之一是,通过产生休眠卵以在不稳定的环境中维持种群的繁衍。前人的研究表明,刚产下的卤虫卵即使在最适孵化条件下其孵化率也很低^[16,17,20,24]。文献[17,19]认为,刚产下的卤虫卵受某些未知的内在代谢机制的控制,而使其处于滞育状态(diapause),必须受到某些特定的非生物信号刺激才能终止这种滞育状态,恢复生理代谢。滞育状态被消除的卤虫卵可称为活性卵(activated cysts)或静止卵(quiescent cysts),在适当的条件下活性卵可孵化成无节幼体。

据报导,能终止卤虫卵滞育状态的方法有:脱水,低温冰冻,双氧水处理,重复脱水吸水,光照,紫外光照射,宇宙线照射,磁场处理,有机溶剂浸泡,去壳处理等。其中以前三者效果较好^[19,20]。此外,文献[17]报导了适合某品系卤虫卵终止滞育状态的方法并不一定适用于另一品系的卤虫卵,例如美国旧金山湾卤虫(*A. franciscana*)的虫卵可用长期低温或浸泡在盐度高于2.0M的NaCl溶液中而活化,而美国加州的摩洛卤虫(*A. monica*)则仅对低温处理有反应。文献[19]也证实了在实验室培养而采收的美国大盐湖卤虫卵在室温下浸泡于饱和卤水中3个月,其孵化率也只有3.7%。

有关我国卤虫卵提高孵化率方法的研究,前人仅限于渤海湾海盐区的卤虫卵^{[2-3](4)},对于卤虫卵的终止滞育状态的方法则未有报导。

天然采集的卤虫卵不利于作为试验材料进行终止滞育状态方法的研究,由于卤虫卵在自然界中受到的环境因子影响并不十分明确,例如,虫卵是在什么样的环境下产生的?已经产下多久?在自然条件下可能已经过冰冻、卤水浸泡、重复吸水脱水(例如在雨季)的处理,而且已接受过紫外光的照射等,因此上述对我国卤虫卵提高孵化率的研究所用的虫卵中有一部分在试验前其滞育状态已经被消除了。

为了进行我国卤虫卵的终止滞育状态的方法的研究,本文在实验室一定的条件下进行了卤虫的批量培养,诱导其产卵,产下的卵在24小时内收集作为研究材料。此外,同时以天然采集的虫卵来探讨提高它们孵化率的方法。本文的最终目的是为卤虫卵的采收,加工的工艺流程设计提供参数。为在育苗工作时如何有效地使用卤虫卵提供参考。

材 料 和 方 法

一、卤虫卵的采集

现场采集的虫卵(表1)根据文献[23]的方法清洗、烘干然后置于-20°C保存,使用时取出于室温下放置一个星期。

二、卵径及卵壳厚的测定

为了探讨壳厚与孵化特性的关系,本文测定了在自来水中浸泡4小时充分吸水后的卵径,去壳后的卵径及壳厚,方法参照文献[2]。

(4) 高言昌、罗炎炎,1987。激光照射对卤虫卵孵化的实验研究。海洋水产研究,(8):31~34。

表 1 各地卤虫采集时的情况
Table 1 Characteristics of the localities when the cysts were collected

地 点	生殖方式	日 期	波美度	温度(℃)	介质类型
埕口盐场	孤雌生殖	1987·8·25	18.0	未测	NaCl
莺歌海盐场	同 上	1986·11·2	21.0	30.5	同上
柯柯盐湖	同 上	1986·8·28	21.4	24.4	同上

三、孵化液的配制与选择

本项仅用莺歌海卤虫卵进行试验。用 Na_2CO_3 ; 甘氨酸-NaOH; Tris-HCl; 硼酸-硼砂; 巴比妥钠-HCl 五种缓冲剂调整煮沸冷却的海水的值, 配制成 PH 为 8.5~8.7 的海水缓冲液^[1], 及人工孵化液^[23]。上述 6 种孵化液在使用前充分充气使溶氧达到饱和, 然后按材料和方法四进行孵化率的测定。当无节幼体孵出后再次测量各孵化液的 pH 值。由于甘氨酸-NaOH 海水缓冲液的孵化效果最好(见结果二), 因此以下各项孵化试验均以此液做为孵化液。

四、测量孵化率的标准方法

先用自来水将虫卵浸泡 1 小时, 除了孵化液改用甘氨酸-NaOH 海水缓冲液外, 其他均按文献[23]进行。孵化期间连续光照强度为 2,000, 水温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 为 8.4~8.5, 孵化进行 48 小时, 每个样品做 5 个重复。

五、孵化前在自来水中浸泡不同的时间对孵化率的影响

将虫卵用 25°C 的自来水分别浸泡 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 小时后, 按材料和方法四进行孵化率测定(以下同)。

六、温度、盐度对孵化率的影响

温度试验采用日本东洋 TN-3 型温度梯度培养器, 温度范围为 $12 \sim 42^\circ\text{C}$, 每隔 1.5°C 一个梯度。盐度设定为 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 60, 80, 100, 120‰ 共 13 个梯度。

七、各地卤虫卵的孵化速率。盐度对孵化速率的影响

按文献[23]的方法进行孵化率的测定, 并利用正交多项式进行数据拟合^[1]绘出孵化速率曲线。盐度对孵化速率影响试验仅用莺歌海卤虫卵为试验材料, 比较 20‰, 35‰ 两个盐度的孵化速率。

八、卤虫的培养与诱导产卵

将孵出的无节幼体直接移入波美 10~11 度的卤水中, 水温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 投喂杜氏藻(*Dunaliella* sp.) 藻液及钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*) 藻泥。杜氏藻是用波美 10 度的卤水配制的 Erd-Schreiber 培养液^[1]培养, 螺旋藻是用 Zarrouk 培养液^[14]培养。

埕口和莺歌海卤虫均同时进行卵生与卵胎生。埕口卤虫按文献[24]的操作规程, 当卤虫出现卵囊时, 逐渐添加 Fe-EDTA, 一星期后使其浓度达 25mg/l , 可有效地诱导大部分的卤虫从卵胎生转变成卵生。对于莺歌海卤虫, 使用上述添加 Fe-EDTA 的方法或用低温(15°C)及控制 12 小时光照/12 小时黑暗的方法^[13]来诱导产卵效果均不理想。本文采用控制投饵量的方法, 每隔两天投喂一次, 可有效地促进卵生。柯柯卤虫则在原有的培养条件下即可获得大量的卤虫卵。产下的虫卵均在 24 小时内收集, 只收集漂浮在培养液表面的虫卵。

九、低温及冰冻对终止滞育状态的效果

将产下 24 小时内收集的虫卵取一部分立即进行孵化率的测定,做为对照。其余的虫卵则放入瓶中,然后置于 5°C, -20°C 两种温度下,隔一定的时间取出,测其孵化率。从 5°C 取出的虫卵在孵化前于室温下放置 5 小时,从 -20°C 取出的虫卵则在孵化前于室温下放置 9 天。

十、盐类饱和溶液,3% H₂O₂ 溶液及 3% 甲醛溶液对终止卤虫卵滞育状态的效果

试验用的盐类饱和溶液有 NaCl (330g/l 蒸馏水), MgCl₂ (1680g/l 蒸馏水)及粗盐饱和溶液。将产下 24 小时内收集的虫卵,在室温下,分别用上述三种饱和溶液浸泡,隔一定时间取出测其孵化率。3% H₂O₂ 的处理方法是将刚产下的虫卵用自来水浸泡 1 小时后,再浸泡在 3% H₂O₂ 溶液中,埕口、莺歌海及柯柯卤虫卵分别浸泡 10,15, 10 分钟后测其孵化率。3% 甲醛处理方法与 3% H₂O₂ 同,埕口、莺歌海及柯柯虫卵分别处理 10,5,30 分钟后测孵化率。

十一、3% H₂O₂、3% 甲醛溶液及去壳溶液处理对天然采集虫卵的孵化率的影响

各地的卤虫卵先浸泡于自来水中 1 小时,然后用 3% H₂O₂ 溶液浸泡 0,5,10,15,20,30,45,60 分钟,然后测孵化率。3% 甲醛试验方法与 3% H₂O₂ 同,处理时间为 0,5,10,20,30,40 分钟。去壳溶液^[21]试验方法亦同上,处理时间为 0,3,6,9,12,15,18,21,24 分钟。

结 果

一、卵径与壳厚 各地卤虫卵的壳厚按厚薄顺序以柯柯、莺歌海、埕口顺序排列。吸水后卵径分别为 299.5 ± 16.2, 276.8 ± 17.5, 273.2 ± 15.6(μm); 去壳后卵径分别为 273.2 ± 13.1, 254.1 ± 18.9; 253.8 ± 16.9(μm); 壳厚分别为 13.2, 11.4, 9.7(μm)。

二、各种孵化液的孵化效果 各种孵化液的 PH 值在孵化前后的变化不同,它们的孵化效果也不同(表 2)。其中以甘氨酸-NaOH 海水缓冲液的效果最好,而在硼酸-硼砂及巴比妥钠-HCl 海水缓冲液中卤虫卵则完全不能孵化。

三、浸泡自来水的对孵化率的影响 埕口、莺歌海及柯柯虫卵分别在自来水中

表 2 各种孵化液在孵化前后的 pH 变化及效果

Table 2 pH values and hatching percentage of the cysts incubated in different hatching mediums

	天 然 海 水					人工孵化液 ^[22]
	Na ₂ CO ₃	甘氨酸-NaOH	Tris-HCl	硼酸-硼砂	巴比妥钠-HCl	
孵化前 pH 值	8.50	8.48	8.67	8.70	8.60	8.50
孵化后 pH 值	6.00	8.40	8.50	8.70	8.51	7.30
孵化率(H%)	75.4	90.8	28.6	0	0	83.1

浸泡 2, 3, 4 小时可得到最高孵化率(表 3)。比未浸泡自来水的虫卵孵化率分别提高了 14.1, 57.1 及 29.3%, 经 t 检验均为差异显著($p < 0.05$), 比浸泡在自来水中 1 小时的虫卵的孵化率分别提高了 4.6, 12.6 及 5.9(%), 经 t 检验也均为差异显著($p < 0.05$)。在超过最佳浸泡时间孵化率又有所下降。

表 3 虫卵浸泡自来水的的时间对孵化率的影响

Table 3 The hatching percentage (H%) of cysts bathed in tap water for different periods of time before incubated in seawater

虫卵来源地	浸 泡 时 间 (小时)							
	0	0.25	0.5	1	2	3	4	5
埕 口	13.1	12.1	22.2	22.6	27.2	25.6	24.2	10.7
莺歌海	27.7	25.7	57.5	72.2	75.2	84.8	84.5	84.5
柯 柯	47.3	57.3	68.9	70.8	未测	71.2	76.7	62.6

四、温度、盐度对孵化率的影响 温度试验的结果见表 4 和图 1—3。盐度试验结果见图 4—6。埕口、莺歌海、柯柯虫卵的最适孵化盐度分别为 30, 20, 35(‰), 最高盐度分别为 100, 120, 80(‰)。当盐度为 0 时, 埕口及莺歌海卤虫卵均可发育到无节幼体, 但孵化率很低, 孵出后很快死亡, 柯柯虫卵则仅能观察到伞期^[23], 但不能突破卵膜而死亡。

表 4 各地卤虫卵孵化的温度范围

Table 4 Temperature ranges for hatching different *Artemia* strains

虫卵来源	孵化温度(°C)	适宜孵化的温度(°C)	最适孵化温度(°C)
埕 口	15.0~40.5	24.0~34.5	25.5~28.5
莺 歌 海	13.5~37.5	19.0~31.0	27.0~30.0
柯 柯	13.5~39.0	21.0~36.0	27.0~33.0

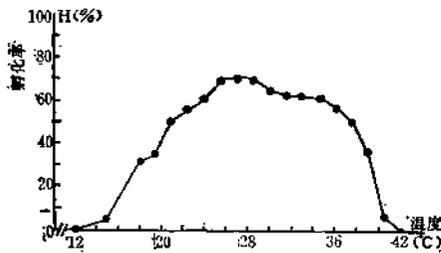


图 1 温度对埕口卤虫卵孵化率的影响

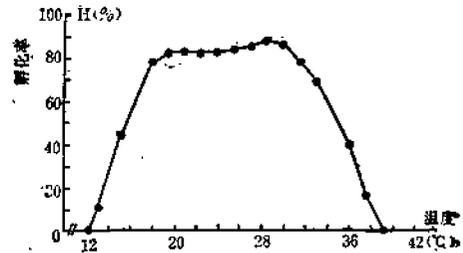
Fig. 1 The effect of temperature on the hatching percentage of *Artemia* cysts from Chengkou Salterns

图 2 温度对莺歌海卤虫卵孵化率的影响

Fig. 2 The effect of temperature on the hatching percentage of the *Artemia* cysts from Yinggehai Salterns

五、孵化速率 埕口卤虫卵的孵化速率最快, 莺歌海次之, 柯柯最慢。但莺歌海虫卵最早出现第一只无节幼体。埕口虫卵与莺歌海虫卵的孵化同步性相对较好, 而柯柯虫卵较差(表 5, 图 7)。第 5, 6 表中, T_0 为第一只无节幼体孵出所需时间; T_{10} 为 10% 无节幼体孵出所需时间; T_{90} 为 90% 的无节幼体孵出所需时间; $T_s = T_{90} - T_{10}$ 为孵化的同步

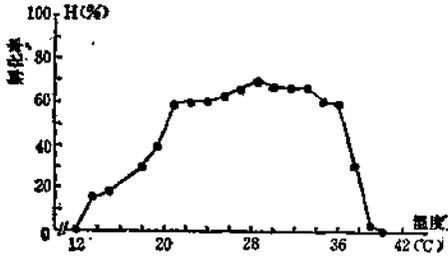


图3 温度对柯柯卤虫卵孵化率的影响

Fig. 3 The effect of temperature on the hatching percentage of the *Artemia* cysts from Salt Lake Keke

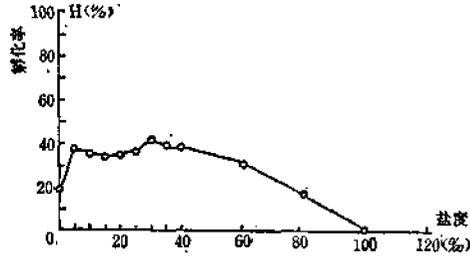


图4 盐度对埕口卤虫卵孵化率的影响

Fig. 4 The effect of salinity on the hatching percentage of the *Artemia* cysts from Chengkou Salterns

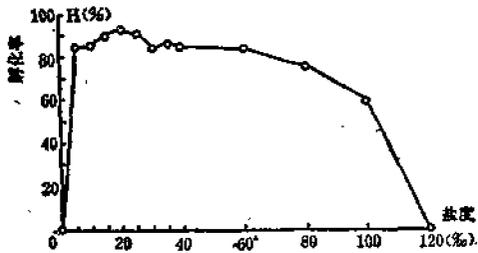


图5 盐度对莺歌海卤虫卵孵化率的影响

Fig. 5 The effects of salinity on the hatching percentage of the *Artemia* cysts from Yinggehai Salterns

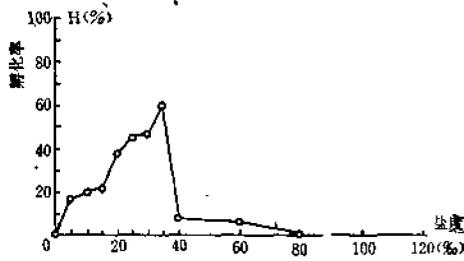


图6 盐度对柯柯卤虫卵孵化率的影响

Fig. 6 The effect of salinity on the hatching percentage of the *Artemia* cysts from Salt Lake Keke

性; $T_{90} - T_0$ 为孵化速率。莺歌海卤虫卵在两个不同盐度下的孵化同步性相同, 但孵化速率不同, 低盐度时孵化速率较快(表6, 图8)。

表5 各地卤虫卵的孵化速率及孵化同步性

Table 5 Hatching rate and hatching synchrony of different *Artemia* strains

虫卵来源	孵化所需时间 (小时)				
	T_0	T_{10}	T_{90}	$T_{90} - T_{10}$	$T_{90} - T_0$
埕口	20.7	21.7	28.2	6.5	7.5
莺歌海	14.5	16.5	22.9	6.4	8.4
柯柯	21.2	25.1	32.5	7.4	11.3

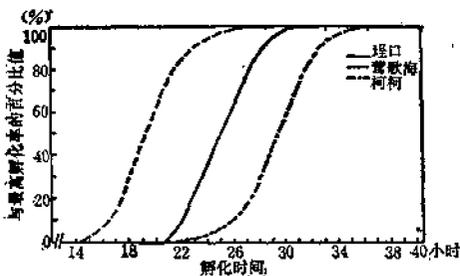


图7 各地卤虫卵的孵化速率曲线

Fig. 7 The hatching curves of *Artemia* cysts from different sources

表 6 莺歌海卤虫卵在两个盐度时的孵化同步性及孵化速率

Table 6 Hatching synchrony and hatching rate of cysts from Yinggehai Salterns incubated in media of different salinities

盐度(‰)	孵 化 T_0	所 需 时 间 T_{10}	所 需 时 间 T_{90}	需 时 间 $T_{90}-T_{10}$	需 时 间 $T_{90}-T_0$
20	13.7	14.7	21.1	6.4	7.4
35	14.5	16.5	22.9	6.4	7.4

六、低温及冰冻对终止滞育状态的效果 产下 24 小时内收集的各地卤虫卵的孵化率为柯柯 1.1 ± 1.0 ; 埕口 4.0 ± 1.7 ; 莺歌海 24.9 ± 2.6 (%)。

低温(5°C)处理对柯柯虫卵的效果最好(图 9), 当放置 60~90 天时, 孵化率可达 97.3~97.6%, 而 90 天后孵化率略有下降, 至 157 天时孵化率仍保持 88% 以上。将埕口卤虫卵放置 5°C 26 天孵化率可达 76.3%, 放置 157 天仍能维持 70% 以上。 5°C 处理虽然对莺歌海卤虫卵也有终止滞育状态作用, 例如放置 42 天时孵化率可达 77%, 但 157 天后下降到 25%。冰冻(-20°C)处理对埕口、柯柯虫卵的效果不如低温处理, 而冰冻时间太长, 例如 100 天后, 孵化率均下降到 20% 以下(图 10)。

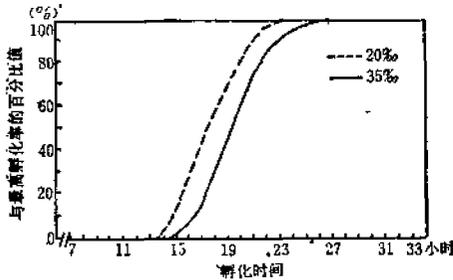


图 8 莺歌海卤虫卵在不同盐度下的孵化速率
Fig. 8 The hatching curves of *Artemia* cysts from Yinggehai Salterns incubated in two different salinities

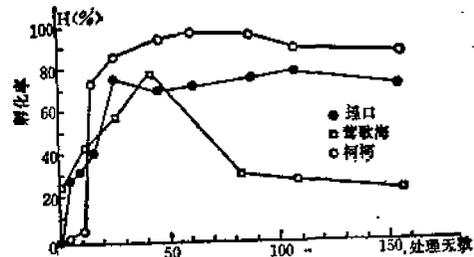


图 9 低温(5°C)处理对终止卤虫卵滞育状态的效果
Fig. 9 Hatchability (%) of lab-produced cysts after pre-incubation at 5°C

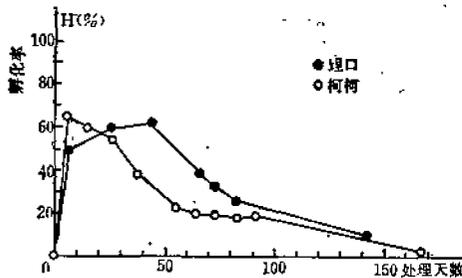


图 10 冰冻(-20°C)对终止卤虫卵滞育状态的效果
Fig. 10 Hatchability (%) of lab-produced cysts after preincubation at -20°C

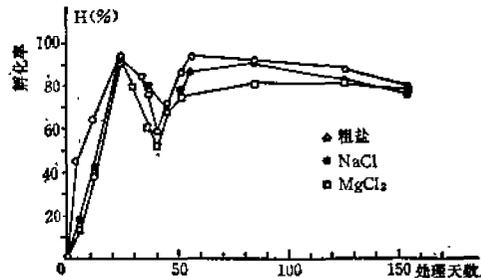


图 11 各种盐类饱和溶液对终止埕口卤虫卵滞育状态的效果

Fig. 11 Hatchability (%) of lab-produced Chenkou Salterns cyst after pre-incubation in different saturated salt solutions

七、盐类饱和溶液, 3% H₂O₂ 溶液及 3% 甲醛溶液对终止卤虫卵滞育状态的效果
 将埕口虫卵用粗盐、NaCl 及 MgCl₂ 的饱和溶液分别浸泡 25 天后, 孵化率可高达 90% 以上, 之后虽然有所下降, 但到 155 天时, 浸泡于粗盐饱和溶液中的虫卵孵化率仍保持在 80% 以上(图 11)。用三种盐类的饱和溶液浸泡对柯柯虫卵的效果不如埕口虫卵。柯柯虫卵在粗盐、NaCl、MgCl₂ 饱和溶液中分别浸泡 166, 36, 25(天)时, 孵化率出现最高值分别为 79.6, 78.7, 68.8(%), 均没有超过 80%(图 12)。粗盐饱和溶液对莺歌海虫卵也很有效, 在第 4 天孵化率即上升到 70%, 至 150 天时可达 90.8%(图 13)。

用 3% H₂O₂ 或 3% 甲醛溶液对三个品系刚产下 24 小时内收集的虫卵处理后, 其孵化率均小于 3%, 与各自的对照组相比, 经 t 检验差异均不显著, 说明这两种方法对终止滞育状态无效。

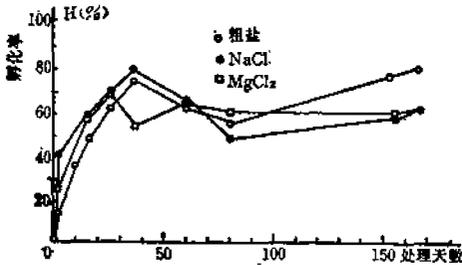


图 12 各种盐类的饱和溶液浸泡对终止柯柯卤虫卵滞育状态的效果

Fig. 12 Hatchability (%) of lab-produced Keke Salt Lake cysts after pre-incubation in different saturated salt solutions

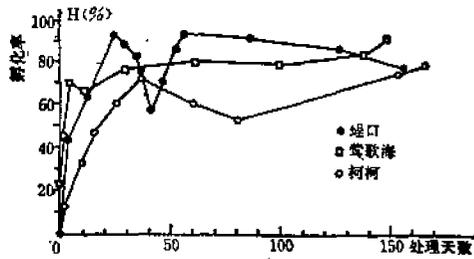


图 13 粗盐饱和溶液处理对终止三个品系卤虫卵滞育状态的效果

Fig. 13 Hatchability (%) of lab-produced 3 strains cysts pre-incubated in saturated crude salt solution

八、3% H₂O₂、3% 甲醛溶液及去壳溶液对天然采集虫卵的孵化率的影响
 用 3% H₂O₂ 处理三个品系天然采集的卤虫卵均能提高孵化率, 埕口、莺歌海、柯柯卤虫卵的最佳处理时间分别为 10, 15, 10 分钟。用这些最佳时间处理分别可使孵化率提高 11.4, 4.6, 3.1(%), 经 t 检验与未处理的对照组均为差异显著 (p < 0.05) (图 14)。用 3% 甲醛溶液

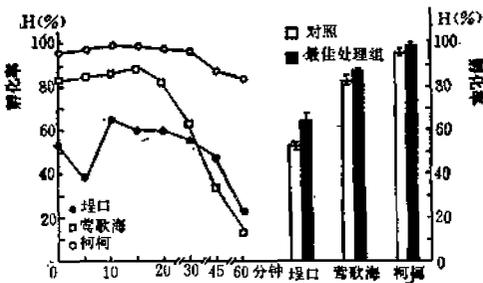


图 14 3% H₂O₂ 处理对天然采集卤虫卵的孵化率的影响

Fig. 14 The effect of 3% H₂O₂ treatment on the hatchability of cysts naturally harvested from different localities (Left). The hatchability of the control and the optimal experimental group (Right)

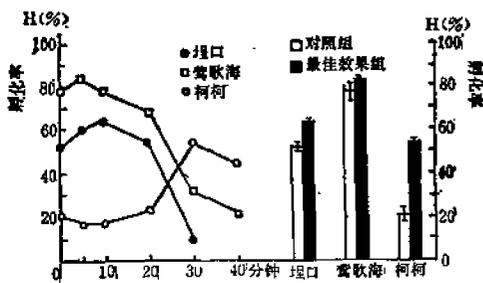


图 15 3% 甲醛溶液处理对天然采集的卤虫卵的孵化率的影响

Fig. 15 The effect of 3% formalin treatment on the hatchability of cysts naturally harvested from different localities (Left). The hatchability of the control and the optimal experimental group (Right)

处理埕口、莺歌海及柯柯卤虫卵得到最佳效果的处理时间分别为 10, 5, 30 分钟, 以这些时间处理后, 孵化率比各自的对照组分别提高了 11.5, 5.5, 及 33.0(%) , 经 t 检验与对照组相比均为差异显著($p < 0.01$) (图 15)。虽然用去壳溶液处理可以提高孵化率, 埕口、莺歌海及柯柯虫卵的最佳处理时间分别为 6, 6, 15 分钟, 但经 t 检验与各自的对照组的差异并不显著(图 16)。

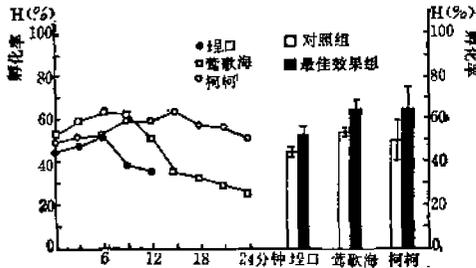


图 16 用去壳溶液处理对天然采集的卤虫卵孵化率的影响

Fig. 16 The effect of decapsulation on the hatchability of cysts naturally harvested from different localities (Left). The hatchability of the control and the optimal experimental group (Right)

讨 论

已报导的充分吸水后卵径最大的是印度的 Tuticorin 产的孤雌生殖卤虫, 为 $289.9 \mu\text{m}$, 其壳厚为 $10.9 \mu\text{m}$ 。曾报导的最大壳厚是委内瑞拉的 Port Araya 产的卤虫卵, 其壳厚为 $11.2 \mu\text{m}$ 。其充分吸水后的卵径为 $249.0 \mu\text{m}$ ^{[28](2)}。柯柯虫卵的卵径与壳厚均大于上述两个品系, 这可能与柯柯卤虫为 4 倍体(未发表)及其栖息的环境有关。

根据前人的研究, 已知在孵化过程中由于胚胎的呼吸作用放出 CO_2 , 因而导致孵化液的 pH 值下降。已有实验证明, 卤虫的胚胎从卵膜突破而出必需经一种孵化酶的作用, 而孵化酶的活性与 pH 值有关, 当 pH 值为 8~9 时, 孵化酶有活性, 否则失去活性^[21]。这可以解释为什么甘氨酸-NaOH 海水缓冲液能得到最佳的孵化效果, 因为这种孵化液具有极好的缓冲效果, 使 pH 值维持在 8~9。人工配制的孵化液^[28]是以 NaHCO_3 来调节 pH 值的, 它的效果虽然不如甘氨酸-NaOH, 但比 Na_2CO_3 的缓冲效果好。至于硼酸-硼砂及巴比妥钠-HCl 因具有毒性, 虽然对 pH 的缓冲效果很好, 但却使虫卵致死。在大规模生产上用 NaHCO_3 来调节海水的 pH 以提高孵化率是比较可行的。甘氨酸-NaOH 配制的海水缓冲液不适用生产, 除了它的成本高外, 作者在试验中观察到伴随着孵化液变为混浊而后孵出的幼体大量死亡, 这种现象在水温高时最易发生, 推测是因为甘氨酸为一种有机物极易引起细菌的大量繁殖, 使孵出的幼体缺氧而死亡。赵乃刚^[9]利用流水孵化能提高孵化率, 推测除了流水方式能提供较多的溶氧外, 同时可使海水的 pH 保持在 8~9。

在孵化卤虫卵之前先让虫卵浸泡于自来水中一段时间可以提高孵化率。本文结果表明, 卵壳越厚, 最适浸水时间就越长。推测是因为壳较厚的卵需要吸入较多的水以便达到较大的内部压力才能达破壳期, 这个结果与推论与[16]的理论是一致的。

试验结果表明, 最适孵化温度与卤虫产地的纬度无一定关系。各地卤虫卵均能在广泛的盐度下孵化, 高盐度时孵化率低可用虫卵需要吸水才能破壳的理论来解释, 而低盐度时孵化率低是因为低盐度虽然利于虫卵破壳, 但不能满足破壳后胚胎对水中各种离子的

需求,因此不能顺利孵出^[22]。

蒋德春^[3]与赵乃刚^[5]报导的适于卤虫孵化的盐度范围与本文结果略有出入,推测因为前者是用 Na_2CO_3 来调节 pH 值至 8.5,而后者则没有调节孵化液的 pH 值,因此它们的试验结果不止受到盐度的影响同时也受到 pH 值变动的影晌。

由于孵出的无节幼体被收获的时间不同,作为饵料的价值也不同,一龄幼体(即无节幼体,Instar I)一般经过 20 小时后脱皮进入二龄幼体 Instar II^[23]。有试验证明在不投饵的情况下,一龄幼体含有的能量及营养价值均高于二龄幼体,因此 T_0 与 T_{00} 相隔的时间越短越好,以 $T_{00} - T_0 < 10$ 小时为佳。因为这样才有利于收获的无节幼体全为一龄幼体。本文结果为埕口、莺歌海虫卵的孵化速率(即 $T_{00} - T_0$)均小于 10 小时,而柯柯虫卵略大于 10 小时。由于孵化速率不仅与卤虫的品系有关,也与收获加工的方法有关^[23],因此本文的结果并不能代表同一品系其他批号的卤虫卵的孵化速率。

前人的研究已证实,在适于孵化的盐温范围内卤虫卵的孵化速率比孵化率更易受盐温的影响^[13,16,22],这与本文结果是一致的。高盐度下 T_0 延后,推测是因为高盐度时渗透压高,卤虫卵需要吸收更多的水分才能达到足够的内部压力而破壳。因此在生产应用时,可视需要在适于虫卵孵化的盐温范围内改变孵化液的盐度或温度,使无节幼体孵出的快些或慢些以适应育苗实际需要。

文献[17]报导了在实验室内用海水培养旧金山湾卤虫,开始时只行卵胎生,当把盐度逐渐增加到 1M NaCl 时开始产下非滞育卵(又称夏卵,或急发卵,subitaneous cysts),非滞育卵具有一层透明的卵膜,沉在底层。它们的孵化率为 $44.7 \pm 2.5\%$ 。将非滞育卵收集后放置在含有 CaSO_4 的容器中干燥 24 小时后,孵化率反而下降到 $14.8 \pm 2.5\%$ 。在上述 1M NaCl 的盐度下培养 2 星期后产下的滞育卵(浮在培养液表层)孵化率只有 $4.7 \pm 1.4\%$ 。美国加州产的摩洛哥卤虫(*A. monica*)的滞育卵的孵化率 $< 1\%$ 。

根据文献[16][17](1)的描述,从形态(具有棕色硬壳)及物理特性(在 B_610 度的卤水中上浮)可以确定本文培养而收集的虫卵即为前人所谓的滞育卵。我们的结果与前人报导的相似,即刚产下的滞育卵的孵化率很低。其中莺歌海卤虫滞育卵的孵化率比较高为 $24.9 \pm 2.6\%$,推测这是因为莺歌海卤虫卵对卤水浸泡的反应特别迅速,莺歌海虫卵在浸泡饱和卤水后 4 天孵化率即可上升到 70% (图 12)。因此有可能部分虫卵在产下后到测定孵化率之前(少于 24 小时)在波美 10~11 度的培养液中其滞育状态就被消除了。

陈清潮等^[4]采集我国北方海盐区天然的卤虫卵,晒干后用海水浸透然后在 -20°C 冰冻 60 天或在 -14°C 冰冻 30 天,能得到 60~90% 的孵化率。本文用 -20°C 冰冻处理得到的最佳孵化率并没有超过 80%,推测这是因为陈清潮等采集的天然卤虫卵已经过其他一些未知因子的作用,这些未知因子中可能有些会加强冰冻的效果。从本文的结果来看,低温或冰冻对柯柯虫卵有较好的活化效果,对莺歌海虫卵的效果最差,这似乎与三个品系卤虫天然栖息的环境有相对应的关系。

用饱和盐水浸泡对埕口、莺歌海虫卵均有较好的效果,而且只要用粗盐即能达到活化的目的。因此卤虫卵在采收后浸泡在粗盐饱和溶液中是一种简便的好方法,因为既能利用比重的差别除去较重的砂石等杂质,又能终止虫卵的滞育状态。浸泡在饱和卤水中除了有脱水作用外,还可能有盐类离子的作用。前人已证实,卤水的盐度越大能溶解的气体

就越少^[23], 因此浸泡在饱和卤水中还有缺氧的作用。文献[2]报导用 40°C 烘烤可明显地提高卤虫的孵化率, 40°C 烘烤除了有温度的作用外, 也有脱水的作用。有关脱水、缺氧、温度、离子作用等各种因子的效果; 用其他波美度卤水浸泡的效果; 以及同时用饱和卤水浸泡与冰冻处理的综合效果如何均有待更进一步试验。

从本文结果看 3% H_2O_2 溶液对终止卵的滞育状态无效, 而对提高天然采集的虫卵的孵化率有一定的效果。文献[19]报导用美国犹他州大盐湖卤虫为实验材料, 在实验室内培养收集的虫卵, 经过饱和卤水浸泡后再以 3% H_2O_2 处理 30 分钟, 可以得到 77.4% 的孵化率。虽然文献[19]的结论中提到 3% H_2O_2 对终止大盐湖虫卵的滞育状态有明显效果, 然而由于他们没有进行用 3% H_2O_2 处理刚产下的滞育卵的试验, 作者认为他们的试验结果并不能将终止滞育状态的效果完全归功于 3% H_2O_2 , 因为孵化率的提高可能也与虫卵已浸泡过饱和卤水有关。

文献[12]认为 H_2O_2 的活性氧原子催化了胚胎发育过程中海藻糖转变成甘油和糖原的氧化还原过程。对于用自来水浸泡 1 小时的卤虫卵而言, 有部分虫卵可能不具备足够的能量吸收足够的水分以达到破壳期, 这一催化作用使含低能量的卵也能达到破壳期从而进一步发育成无节幼体, 因此能提高孵化率。

前人不曾报导过用甲醛溶液处理可提高孵化率。3% 甲醛处理除了有杀菌作用外, 对胚胎的代谢活动的影响则尚未明了。未经消毒处理的卤虫卵的表面有大量的细菌^[9,10]。为了除去在孵化过程中因细菌大量繁殖而对孵化产生不利的影响, 一般在国际上的商品卤虫卵在加工过程中均经过消毒处理, 消毒处理所用的药品有次氯酸钠, H_2O_2 , 甲醛, 或抗生素等, 从本文结果来看在大规模加工或孵化卤虫卵前用甲醛溶液处理是一举两得的好方法。为降低成本, 是不是可将甲醛溶液的浓度降低而增加处理的时间而得到相同的效果则有待更进一步试验。

去壳溶液处理对提高 3 个品系卤虫卵孵化率的效果不明显, 李茂堂等^[9]报导了用天津地区的虫卵做试验有相似的结果。文献[23]报导将我国天津出口的卤虫卵用去壳溶液处理后可提高孵化率 4%, 有些品系的卤虫卵用去壳溶液处理可得到明显的效果, 例如加拿大 Chaplin 湖的卤虫卵去壳后孵化率可增加原有的 132%。

本文结果为各地卤虫卵的最佳去壳处理时间不尽相同, 这与[3]的结果相似。在试验中我们也观察到得到最佳孵化率的去壳卵, 它们的外壳并没有完全除去, 这可能是因为完全除去外壳的虫卵只剩下很薄的卵膜, 卵内的胚胎易受到去壳溶液中活性氯原子的伤害, 反而使孵化率降低。去壳卵的孵化率能提高可能是因为去壳后虫卵内的幼体所需破壳的能量相对减少, 因此那些能量低于“孵化能量阈”的虫卵也能孵化, 从而提高了孵化率。

有关各种方法对卤虫卵终止滞育状态的作用机制前人作了种种推测, 但至今仍然没有定论^[17,19]。从本文的结果作者尚无法解释这些现象的机制, 而唯一能得到的结论是各种卤虫品系的虫卵滞育状态的有效终止方法通常与该品系的生态环境有相应的关系。

前人已证实, 喂养亲代的饵料量与饵料种类与其产生的虫卵的孵化率有明显的关系^[19]。除了内在的遗传因子外, 外在的环境因子同样能影响滞育卵对各种处理方法的反应。因此在设计卤虫卵的加工工序时, 不仅应考虑到卤虫的品系, 同时也要考虑卤虫生长繁殖的环境因子。例如, 在大规模用农副产品(如酵母、玉米面、米糖)作为卤虫主要的饲

料养殖卤虫而采收的虫卵的加工方法与天然产的卤虫卵用同样的终止滞育方法是否能得到相似的结果,均需进行试验才能得到正确的结论。

参 考 文 献

- [1] 中科院青藏高原综合科学考察队, 1963. 西藏水生无脊椎动物, 492. 科学出版社。
- [2] 叶锦春, 张洁明, 1986. 提高卤虫孵化率的一种新工艺. 淡水渔业, (3):36~40。
- [3] 李茂堂等, 1982. 去壳虫卵在水产养殖中的应用. 海洋湖沼通报, (1):45~49。
- [4] 陈清潮等, 1975. 卤虫卵的资源及提高孵化率的方法. 动物学杂志, (3):21~23。
- [5] 赵乃刚, 1980. 影响卤虫(丰年虫)孵化率的一些因子及其流水孵化工艺. 水产科技情报, (6):3, 10~11。
- [6] 张龙翔等, 1980. 生化实验方法和技术, 附录 5: 缓冲溶液. 高等教育出版社。
- [7] 徐萃薇, 1985. 计算方法引论. 第三章, 数据拟合法, 54~75. 教育出版社。
- [8] 湛江水产专科学校, 1980. 海洋饵料生物培养, 89~105. 农业出版社。
- [9] Austin, B.; A. Allen, 1981 Microbiology of laboratory-hatched brine shrimp. *Aquaculture*, 26: 369-383.
- [10] Benijts, F. et al., 1976. Change in the biochemical composition of the early stages of the brine shrimp, *Artemia salina* L. In: Persoone, G. and E. Jaspers, (eds.), *Proc. 10th European Symposium on Marine Biology*, 1: 1-9. Universa Press, Wetteren, Belgium.
- [11] Berthelemy-Okazaki, N., 1985. Regulation of cyst formation in the brine shrimp *Artemia*. In: Book of Abstracts, *2nd International symposium on the Brine Shrimp Artemia*. Sept. 1-5, 1985, Antwerp, Belgium.
- [12] Bogator, I. B. & Z. I. Schmakova, 1980. Activation of diapausing eggs of *Artemia salina*. *Gidrobiol. Zh.*, 16(3): 108-110.
- [13] Boone, F. & L. G. M. Baas-Becking, 1931. Salt effects on egg and nauplii of *Artemia salina* L. *J. Gen. Physiol.*, 14: 753-763.
- [14] Borowitzka, M. A., 1988. Appendix: Algal media and sources of algal cultures, 456-465. In: *Micro-algal Biotechnology*, Borowitzka, M. A. & L. J. Borowitzka, (eds.). Cambridge Univ. Press, New York.
- [15] Clegg, J. S., 1964. The control of emergence and metabolism by external osmotic pressure and the role of free glycerol in developing cysts of *Artemia salina*. *J. Exp. Biol.*, 41: 879-892.
- [16] Clegg, J. C. & F. P. Conte, 1980. A review of the cellular and development biology of *Artemia*, 11-54. In: *The Brine Shrimp Artemia*. Vol. 2, *Physiology, Biochemistry, Molecular Biology*. Persoone, G. et al. (eds.). Universa Press, Wetteren, Belgium, 686 pp.
- [17] Drinkwater, L. E. & J. H. Crowe, 1987. Regulation of embryonic diapause in *Artemia*: environmental and physiological signals. *J. Exp. Zool.*, 241: 297-307.
- [18] Gilmour, A. et al., 1975. Antibiotic sensitivity of bacteria isolated from the canned eggs of the Californian brine shrimp (*Artemia salina*). *Aquaculture*, 6(2): 221-231.
- [19] Lavens, P. et al., 1986. International study on *Artemia*. XLI. Influence of culture conditions and specific diapause deactivation methods on the hatchability of *Artemia* cysts produced in a standard culture systems. *Mar. Ecol.*, 31: 197-203.
- [20] Morris, J. E., 1971. Hydration, its reversibility and the beginning of development in the brine shrimp, *Artemia salina* *Comp. Biochem. Physiol.*, 39A: 843-857.
- [21] Sato, N. L., 1967. Enzymatic concentration to the encystment of *Artemia salina* *Sci. Rep. Tohoku Univ.*, 33(3-4): 319-327.
- [22] Sorgeloos, P., 1980. The use of the brine shrimp *Artemia* in aquaculture. In: Persoone, G. et al. (eds.). *The Brine Shrimp Artemia*. Vol. 3. *Ecology, Culturing, Use in Aquaculture* 25-46. Universa Press, Wetteren, Belgium.
- [23] Sorgeloos, P. et al., 1986. *Manual for the culture and use of brine shrimp Artemia in aquaculture*, 319. State University of Ghent, Belgium.

- [24] Versichele, D. & P. Sorgeloos, 1980. Controlled production of *Artemia* cysts in batch cultures, 231-246. In: Persoone, P. et al., (eds.). The Brine Shrimp *Artemia*. Vol. 3, *Ecology, Culturing, Use in Aquaculture*. Universa Press, Wetteren, Belgium.

HATCHING CHARACTERISTICS OF BRINE SHRIMP CYSTS FROM CHINA

Yang Na, Bian Bozhong and Li Mingren

(*Micro-Algae Culture Centre, Ocean University of Qingdao*)

ABSTRACT Cysts of Brine shrimp (*Artemia salina*) were collected from three different places in China, from Chengkou Salterns of Shandong, Yinggehai Salterns of Hainan Island and Salt Lake of Qinhai. The chorion thickness of the cysts of the three strains were 9.7 μ m, 11.4 μ m and 13.2 μ m respectively. The highest hatchabilities were obtained by incubating the cysts in freshwater for 2, 3 and 4 hours respectively before hatching in sea water. The optimal hatching temperature were 25.5–28.5°, 27.0–30.0° and 27.0–33.0°C with the optimal salinities 30, 20 and 35‰, the hatching period were 6.5, 6.4 and 7.4 hours separately.

The cysts were collected in 24 hours after production and cultured under laboratory condition. The effects of different deactivation treatments on the hatchability were studied. The most effective treatments were as follows,

1. For the chengkou cysts, the hatchability of 91–94% was achieved by soaking the cysts in saturated crude salt solution for 2–3 months.
2. For the Yinggehai cysts, the hatchability of 80–90% was achieved by soaking the cysts in saturated crude solution for 2–5 months.
3. For the Salt Lake cysts, the hatchability of 96–98% was achieved after pre-incubation the cysts in 11° Bé brine at 5°C for 2–3 months.

However, the newly produced cysts could not be activated by soaking in 3% H₂O₂ or formaldehyde solution. Moreover, the hatchability of the cysts collected naturally can be increased by soaking in 3% H₂O₂, 3% formaldehyde, or decapsulation treatment.

KEYWORDS cysts of brine shrimp, hatchability, deactivation