

研究通讯

试验用大型溞 (*Daphnia magna*) 的培养方法

B. 罗特*

(德意志联邦共和国, 辐射与环境研究中心生态化学研究所)

张甬元

(中国科学院水生生物研究所)

由于大型溞(*Daphnia magna*)的生长周期短、易培养且是水生态系中的一种重要的代表性生物。因此,许多国际组织^[1,2]和国家^[3,4]都推荐用大型溞作为生态毒理试验的试验生物。然而,关于试验用的大型溞的培养方法多为互相传授,在文献中很少见到系统的报导。在许多有关大型溞毒性试验的操作规程中,如世界经济发展与合作组织(OECD)出版的“化学物质试验方法指南”,只强调如何进行毒性试验及在试验中的注意事项,而对试验生物的要求只原则地提到要选用健康的个体。因此,在实际操作中常常遇到一些困难,由于未能获得健康的个体而影响试验结果。大型溞也是我国北方常见的溞类。目前国内不少科研和教学单位也开始用来作为生态毒理研究的试验生物。本文介绍了我们在大型溞培养实践中的经验和有关注意事项供从事这一工作,特别是初次进行大型溞培养人员参考。所介绍的方法对其它溞类如蚤状溞(*Daphnia pulex*)的培养也有参考意义。

一、试验生物的品系

在欧洲共同体所属国家,用来做毒性试验的大型溞大都来自于法国(IRCHA, Centre de Recherches, Vert Le Petit France)。

也可以用其它品种,但应注意在试验中必须采用同一个种,以保证获得可以比较的实验结果。

二、培养液

培养大型溞的培养液可采用处理和曝气过的自来水。在早期的文献中,认为大型溞只有在自然水中才能正常繁殖。以后证明人工配制的培养液同样可以长期保持大型溞的正常繁殖能力。人工配制培养液的化学组份已有许多文献作了报道,如荷兰推荐的配方为每升蒸馏水中含 NaHCO_3 270mg, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 320mg, NaCl 29mg, NaNO_3 9mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 151mg, 和 Na_2SO_4 79mg。硬度相当于 CaCO_3 200mg/l。

在配制培养液过程中必须注意以下条件:

——因大型溞对铜离子敏感,配制时不能接触铜质器皿,

——培养液中不能存在游离氯

——推荐培养液的 pH 值为 7.8 ± 0.4 。不能将大型溞从已适应的 pH 环境中立即转移到另一个 pH 值相差很大的培养液中,要改变培养液的 pH 值务必缓慢进行,使生物

* 本文系 B. 罗特博士在中国科学院水生生物研究所参加协作研究期间撰写。

有一适应过程。此外，pH 会影响某些化学物质的毒性。因此，在进行毒性试验时应注意 pH 值的变化。

——较大幅度改变培养液中的碳酸盐含量时也应同改变 pH 值一样要缓慢进行，一般每小时约更换 10% 的培养液才能使之较好地适应。每次曝气的时间也应保持一致，以便使碳酸盐含量相对稳定。

——培养液中溶解氧应保持在 80% 饱和度左右。当用藻类作为大型蚤的饵料时，一般能较好地保持氧的条件。如用其它饵料，则培养时应曝气，否则将会因缺氧而使培养物死亡。

培养液最好隔天更换一次，也有人认为 3 天换一次较好。但无论如何每天应作一次仔细观察，以便及时处理所发生的异常情况。

三、饵料

饵料的质量对获得健壮的培养物也是一个很重要的因素。根据溶解氧的状况，可以分为产氧性饵料和耗氧性饵料。产氧性饵料是指各种藻类，应注意红藻不宜作为大型蚤的饵料。通常用绿藻较为合适。只要培养液有适当的光照，藻类可以通过光合作用为培养液提供溶解氧，甚至可以使培养液中的溶解氧接近饱和度。由于光合作用消耗二氧化碳，因此水中酸碱度会有所上升，不过这种 pH 变化在晚间又会恢复正常。

用藻类作饵料时，可以用单种藻类也可以用混合培养物，如栅藻和小球藻混合使用，也可与其它饵料如酵母粉相混合。还有人提出加入植物提出液、果汁、活性污泥和鱼类饵料提出物等，甚至还有加入大型蚤提出物。各实验室可以根据具体情况试验后确定。

耗氧性饵料主要是由酵母或其它有机物制成。使用这种饵料很容易引起水中细菌繁殖，影响水质。因此，培养液必须充气。值得指出的是饵料的颗粒必须足够小，使幼小的

个体能够食用。大型蚤的幼体也可利用水中的微生物作食料。

四、大型蚤从培养液中的分离

从培养液中分离大型蚤时，往往易受损伤，特别是幼体常因操作不慎接触空气而使身上带有小气泡，这种带气泡的个体很容易死亡。这里我们推荐用两个不同孔径的尼龙筛子分离大型蚤的成体和幼体，效果很好（见图 1）。当培养物倒入上面的筛子时，其孔径约 $1 \times 1\text{mm}$ ，只能让幼体通过，而成体仍留在上筛，下面筛子的孔径较小，不让幼体通过。操作时把下面筛子的三分之一高度淹没在水中，从而使幼体在分离时始终在水里，不易受到损伤。留在上筛的大型蚤母体应及时用洗并将其冲入培养液中。成体和幼体分开后可以用吸量管转移，但吸管顶端的孔径必须能保证大型蚤自由通过。用没有刻度的吸管转移可更容易观察试验生物的健康状况。幼体也可用塑料匙转移。

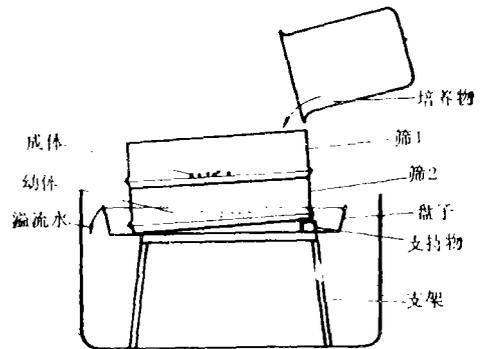


图 1 分离大型蚤幼体的装置示意图

在进行 50% 受影响浓度 (EC_{50}) 试验和其它试验时，为获得小于 24 小时龄的幼体可按以下二次筛分法分离：经第一次筛分后，去除幼体，经 18 小时后再进行第二次分离。所分出的幼体皆为小于 18 小时龄。幼体放置 2—6 小时后去除在操作过程中受损伤或死亡的个体，然后取健康的幼体进行试验。

为了保证培养物有旺盛的繁殖能力,每次分离后应留下一部份幼体以更新衰老的母体。

五、培养器皿

根据我们和许多其它实验室的经验,用 2 升烧杯进行培养比较方便。每个烧杯放 50—100 个大型蚤成体。密度太大繁殖率降低并容易转变为有性繁殖产生冬卵,每次更换培养液时烧杯必须洗净后再用。

六、光照和温度

大型蚤对温度比较敏感。培养时一般应控制在 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 超过 25°C 生长受明显影响。

关于光周期,欧洲共同体成员国推荐在进行慢性毒性试验时控制光: 暗为 16:8 小时。有人发现蚤状蚤 (*Daphnia pulex*) 对光周期比较敏感,需要经较长时间才能适应,并发现光周期能影响某些化合物的毒性。但大型蚤是否对光周期敏感尚未见报导。鉴于大型蚤和蚤状蚤二者很相似,因此,在进行慢性毒性试验时应调节合适的光周期。

七、培养生物的健康状况

试验生物的健康与否将直接影响毒性试验结果。有时大型蚤体色呈灰白,多因微生物寄生所致,表示健康状况不良。这些大型蚤不会立即死亡,但繁殖率很低。如用这样生物进行试验将不可能获得好的试验结果。

在培养过程中,最重要的是每天应进行认真的观察。一个有经验者可以很快发现培养物所发生的异常情况。最明显的是健康的个体有很高的繁殖率。在欧洲共同体的有关操作规程中指出每个正常的大型蚤在 14 天培养中至少要繁殖三次,产仔 20 个。通常繁殖三次可产仔 50 个,最多达 100 个。健康的成体呈暗红色并进行频繁和规则的运动。不

健康的个体常呈灰色,活动滞呆,很容易用吸管捕捉到。

在培养过程中,如果发现生长不良或被细菌感染,可用以下几种方法处理:

1. 从其它实验室重新引入健康的个体进行培养。在此情况下必须了解该实验室的有关培养条件。根据我们的经验,保持好的培养条件、每天清除不健康的个体对维持大型蚤旺盛生长是十分必要的,否则 5—6 周后全部培养物体质就会变差。

2. 选出一些外观健壮的个体,并分别单个放入小烧杯中培养,每天记录新生幼体的数目,培养 10—14 天,选择繁殖率最高的一组继续扩大培养。

3. 对染菌的培养物可以用化学品进行治疗,常用的有三种药物:

(1) 亚甲基蓝,配制 0.1% 亚甲基蓝水溶液作贮液,再将贮液稀释 100 倍作为工作液。然后将大型蚤筛出放入亚甲基蓝的稀释液中,处理 1 分钟后取出,继续培养。

(2) 链霉素,先配成 1g/l 的贮液,再取 5ml 贮液稀释到 1 升 (即 5mg/l) 作为工作液,放入培养物,处理 24 小时后继续培养。

(3) 甲醛,配制 0.1mg/l 溶液,处理 48 小时。

经药物处理后,第一代幼体不宜用来做毒性试验,可留种进行繁殖。

参 考 文 献

- [1] OECD Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, (1981).
- [2] Degradability, Ecotoxicity and Bio-accumulation, The Determination of the Possible Effects of Chemicals and wastes on the Aquatic Environment, Government Publishing Office, Netherlands, (1980).
- [3] International Organization for Standardization (ISO) ISO Document. (1979).
- [4] Methods for Acute Toxicity Tests with Fish, Macro-invert-brates and Amphibians, EPA-Report 660/3-75-009 (1975).