

光合成细菌桃红荚硫菌 对臂尾轮虫的饵料价值

坂本 久 平山和次

本研究的目的在于采用红硫菌科(Chromatiaceae)的一种光合成细菌作为培养轮虫的饵料,并探讨其饵料价值。实验证明,单纯用光合成细菌桃红荚硫菌(*Thiocapsa roseopersicina*)作轮虫的饵料,其价值甚小,因此就在桃红荚硫菌中混以面包酵母或小球藻进行实验。

材料与方法

本研究使用的桃红荚硫菌是由长崎大学于1978年从贝池分离出来的;采用Fuller氏的无机培养基,在100毫升的密封容器中,以100瓦白炽灯连续照明(约3,000勒),约25℃的条件下培养出来的单种。

红硫菌科的光合成细菌具有将硫化物氧化为硫酸盐体内的增殖阶段和将体内的硫进一步氧化成硫酸盐以备消费的两个阶段。本实验把可以从色调上用肉眼区别开的这两个阶段分别称为对数增殖期和稳定期。面包酵母由协和发酵工业KK提供。将其用容量为200毫升的平底烧瓶,在室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 的通风

条件下培育达到对数增殖期供实验用。海产小球藻是用Erd-Schreiber修正培养液,在 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 无菌条件下静置培育的。实验用的鱼肝油是理研维生素KK提供的鲑鱼肝油。

无菌轮虫新产卵,是从活跃增殖的轮虫种群采收的,用亚甲蓝(16ppm)及含抗生素的溶液(表1)给新产卵灭菌,然后充分洗净,再从无菌新产卵中只选用已经在卵壳内蠕动纤毛冠的,最后通过厌氧灭菌培养基给卵进行无菌检查。

表1 混合抗菌素的成分(1毫升)

抗 菌 素	含 量
多粘菌素B硫酸盐	110单位
庆大霉素硫酸盐	0.6毫克
盐酸四环素	0.26毫克
氯霉素	0.30毫克
青霉素G	1,930单位
苄青基硫酸盐	± 10 单位

饲养用海水采用活性炭处理过的稀释海水(13~14%Cl),稀释海水在实验前的2~

3天,用高压灭菌器进行加热灭菌(以下简称饲育海水)。

当用桃红荚硫菌和面包酵母作饵料时,必须去掉培养基只用菌体,再用饲育海水进行数次离心分离洗净。用小球藻作饵料时,每份培养液必须加饲育海水稀释。

如上制成的饵料悬浮液的浓度可以根据分光光度计(日立102型)测定的吸光度换算出来。不同饵料的浓度和吸光度之间的关系,当用波长为420nm、2厘米吸收池时,可以用以下的回归直线式表示。以饵料浓度为D、吸光度为C的话,不同饵料的浓度分别表示如下:

桃红荚硫菌的浓度:

$$D = 7.00C \times 10^7 (\text{细胞/毫升})$$

面包酵母的浓度:

$$D = 704C (\text{微克/毫升})$$

小球藻的浓度:

$$D = 213C \times 10^5 (\text{细胞/毫升})$$

为验证各种营养素对桃红荚硫菌的添加效果,先将所用的脂溶性维生素、鱼肝油,溶于乙醇中放入冷库保存。实验前用注射针喷射到蒸馏水里制成乳剂后进行高压灭菌。当把洗净了的桃红荚硫菌细胞放入饲育海水制成饵料悬浮液时,再用无菌手续添加乳剂。

每个实验都采用同一个群体的轮虫新产卵,依靠不同条件下的双份饵料悬浮液进行培育,从而比较相互之间的增殖状况,并探讨其饵料价值。

实验全部在无菌条件下进行,实验水温为 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, pH是7.8~8.1。

判断饵料价值采取以下两种方法。第一种叫做“成批培育法”(batch culture)。具体方法是,在每个加入5毫升饵料悬浮液的试管里,各放进5个轮虫新产卵,不更换饵料悬浮液一直存放1周左右。将此期间轮虫个体增加数作为指标值。为了防止饵料沉淀,培育期间每天轻轻摇动两次试管,使饵料均匀。供试验用的轮虫新产卵,每种饵料为10~30个。

第二种方法叫做“个别培育法”(individual culture)。其做法是,每个试管各放入4毫升饵料悬浮液和2个轮虫新产卵,每天在同一个时间内进行观察,并记录最初放入的轮虫的成活率、产卵数、仔虫数。随后把脱离开亲虫的卵和仔虫全部除去,只把亲虫和附着在亲虫上的卵移换到新饵料悬浮液里,观察其整个生活史。每种饵料的新产卵为11~18个。按照上述操作,能够得出轮虫每天的成活率和每个轮虫的产卵数,由此能够设想轮虫具有哪些特性,根据Birch的方法计算出轮虫实际种群增长率(intrinsic rate of population increase, r)和净繁殖率(net reproduction rate, R_0)作为增殖的指标值。

结 果

单独投喂

首先将处于对数增殖期、稳定期的桃红荚硫菌分别单独投给轮虫,比较它们的饵料价值。

从“成批培养法”(表2)和“个别培养法”(表3)的两个实验结果可以看出,投给处于对数增殖期的细胞,一部分轮虫增殖。与此相反,投给处于稳定期的细胞几乎看不出轮虫增殖。在所有的实验中,处于对数增殖期和稳定期的细胞浓度存在一定的差异,因在稳定期的细胞中一部分菌体处于收缩状态,所以两者从数量上看几乎相等。

表2 在处于对数期、稳定期的桃红荚硫菌悬浮液中,用成批培育法培育轮虫的生长状况

桃红荚硫菌		个 体 数				
生长时期	浓 度 (10^6 细胞/毫升)	接种时	接种后第8天			
			成活	卵子	死亡	总数
对数期	8.5	30	39	21	26	86
	10.5	30	7	32	50	89
稳定期	4.8	30	17	10	15	42
	14.3	30	9	16	15	40

表3 在处于对数期、稳定期的桃红荚硫菌悬浮液中, 用个别培育法获得的轮虫增长的指标值

实验编号	桃红荚硫菌		实际种群增长率(r)	净繁殖率(R_0)
	生长期	浓度(10^6 细胞/毫升)		
I	对数期	3.0	0.36	2.83
	稳定期	6.7	0.002	0.12
II	对数期	7.0	0.42	3.30
	稳定期	9.5	0.002	0.08

用稳定期的桃红荚硫菌培育轮虫, 轮虫几乎不增殖, 所以以后的实验全部采用对数增殖期的细胞。

为了求出桃红荚硫菌的浓度与轮虫增殖的关系, 将桃红荚硫菌分成几个不同的浓度投给轮虫。其结果分别如表4(成批培养法)和表5(个别培养法)所示。

表4 在不同浓度处于对数期的桃红荚硫菌悬浮液中, 用成批培育法培育轮虫的生长状况

实验编号	桃红荚硫菌的浓度(10^6 细胞/毫升)	个 体 数				
		接种时	接种后第五天(实验I)和第七天(实验II)			
			成活	卵子	死亡	总数
I	5.6	30	72	65	9	141
	10.7	15	34	26	15	72
II	7.0	30	48	57	59	153
	14.0	30	19	24	50	81
	28.0	30	3	23	21	49

表5 在不同浓度处于对数期的桃红荚硫菌悬浮液中, 用个别培育法获得的种群增长指标值

桃红荚硫菌的浓度(10^6 细胞/毫升)	实际种群增长率(r)	净繁殖率(R_0)
1.4	0.39	4.61
3.5	0.42	5.06
7.0	0.56	7.02
14.0	0.35	2.36

成批培育法分两次试验了桃红荚硫菌($5.6 \sim 28.0$) $\times 10^6$ 细胞/毫升的浓度范围, 结果证明浓度达到 10×10^6 细胞/毫升以上, 轮虫的增殖数显然降低。个别培育法是在桃红荚硫菌为 3.5×10^6 细胞/毫升时, 分别得到实际种群增长率为0.62和净繁殖率5.00的最大值。但浓度达到 14×10^6 细胞/毫升时, 指标值就相当低。

混和投喂

在桃红荚硫菌中混以面包酵母投喂轮虫, 按照成批培育法和个别培育法进行实验的结果分别列入表6、表7。从表中的结果可以看出, 混合饵料比单纯饵料的饵料价值高。在成批培育法中, 当混以50微克/毫升的面包酵母时, 轮虫的增殖效果特别好。在个别培养法中, 每个培育例所用投饵量几乎

表6 在桃红荚硫菌和面包酵母的混合悬浮液中, 用成批培育法培育轮虫的生长状况

桃红荚硫菌浓度(10^6 细胞/毫升)	面包酵母(微克/毫升)	接种时	接种后第7天			
			成活	卵子	死亡	总数
7.0	0	30	102	54	64	216
7.0	8.6	30	312	15	50	377
7.0	50.0	30	573	27	69	669
0	50.0	30	18	7	12	37

表7 在桃红荚硫菌和面包酵母的混合悬浮液中, 用个别培育法获得的轮虫种群增长的指标值

实验编号	依 度		实际种群增长率(r)	净繁殖率(R_0)
	桃红荚硫菌(10^6 细胞/毫升)	面包酵母(微克/毫升)		
I	7.0	0	0.37	4.29
	7.3	13.0	0.69	10.28
	14.8	10.0	0.34	5.40
	0	53.0	0.11	1.40
II	7.0	0	0.62	7.79
	7.0	5.4	0.80	9.06
	0	5.0	0.002	0.56

相等,如改变桃红荚硫菌和面包酵母混合的比例进行实验,使桃红荚硫菌的浓度一定,降低添加面包酵母的浓度,结果证明,即使面包酵母添加的比例很低,也能改善桃红荚硫菌的饵料价值。

在桃红荚硫菌中混以小球藻投喂轮虫,按照成批培育法和个别培育法进行实验的结果分别如表8、表9所示。

表8 在桃红荚硫菌和小球藻的混合悬浮液中,用成批培育法培育轮虫的生长状况

桃红荚硫菌	小球藻	浓度(细胞/毫升)	个 体 数			
			接种后第5天			
			成 活	卵 子	死 亡	总 数
5.6×10^6	0	30	72	66	3	141
5.6×10^6	3.2×10^5	30	344	146	4	494
10.5×10^6	0	15	34(68)	26(52)	12(24)	72(142)
10.5×10^6	3.2×10^5	10	183(549)	100(300)	0(0)	283(849)
0	3.2×10^5	30	138	58	1	197

表9 在桃红荚硫菌和小球藻的混合悬浮液中,用个别培育法获得的轮虫种群增长指标值

实 验 编 号	浓度(细胞/毫升)		实际种群 增长率(r)	净繁殖率 (R_0)
	桃红荚硫菌	小 球 藻		
I	7.0×10^6	0	0.58	1.52
	7.0×10^6	5.0×10^4	0.83	15.41
	0	5.0×10^4	0.21	3.13
II	7.0×10^6	0	0.62	3.70
	7.0×10^6	5.0×10^4	0.91	18.05
	0	5.0×10^4	0.41	0.49

成批培育法用桃红荚硫菌两个不同浓度混以小球藻(3.2×10^5 细胞/毫升)进行实验,个别培育法在 7.0×10^6 细胞/毫升的桃红荚硫菌中混以小球藻(5.0×10^4 细胞/毫升)进行两次实验。全部实验证明,混入小球藻的各种浓度与桃红荚硫菌的浓度相比都很低,这些浓度与单纯用小球藻作饵料的最佳量 1.5×10^6 细胞/毫升相比,在成批培育法中

约为1/5,在个别培育法中约为1/30。尽管如此,两者混合的饵料比两者分别单独投喂其饵料价值的指标值明显增高。

添加脂溶性维生素、鱼肝油的效果

在桃红荚硫菌(7.0×10^6 细胞/毫升)中分别添加脂溶性维生素(维生素A、D、E)和鱼肝油。用成批培育法、个别培育法进行实验的结果分别如表10、表11所示。

表10 在桃红荚硫菌(7.0×10^6 细胞/毫升)悬浮液中添加脂溶性维生素或鱼肝油用成批培育法培育轮虫的生长状况

维生素或鱼肝油	浓 度 (微克/毫升)	接种时	个 体 数			
			接种后第7天			
			成 活	卵 子	死 亡	总 数
维生素A	—	30	102	51	63	216
	1.0	30	300	101	296	697
	4.0	30	618	29	19	666
维生素D	0.1	30	196	107	119	442
	0.4	30	0	10	79	89
维生素E	0.5	30	2	10	77	89
	2.0	30	4	10	56	70
鱼 肝 油	1.0	30	457	45	35	537
	4.0	30	530	27	40	597

表11 在桃红荚硫菌(7.0×10^6 细胞/毫升)悬浮液中添加脂溶性维生素或鱼肝油,用个别培育法获得的轮虫种群增长指标值

维生素或鱼肝油	浓 度 (微克/毫升)	实际种群增 长率(r)	净繁殖率 (R_0)
—	—	0.42	3.30
维生素A	2.5	0.58	6.50
维生素D	0.5	0.62	1.04
维生素E	1.2	0.20	1.70
鱼 肝 油	7.0	0.82	2.75

成批培育法的实验结果表明,添加维生素的量可以使轮虫的繁殖数增多,个别培育法也有同样的结果。

从成批培育法的实验结果可以看出,在

加维生素D 0.1微克/毫升的组比不添加的组增殖效果好。可是添加维生素D 0.4微克/毫升组到了第7天轮虫的成活数为0，增殖数也比不添加的组少。个别培育法的结果也是添加维生素D 0.5微克/毫升组的指标值比不添加组低。添加维生素E，用两种培育法所得到的指标值都低。特别是成批培育法的结果，到了第7天成活数极少，增殖数也少。

成批培育法的实验结果证明，在添加鱼肝油1.0、4.0微克/毫升的组内有效果。浓度为5.0微克/毫升的添加组内，用个别培育法实验没有添加效果。

讨 论

上述实验证明，单纯用桃红荚硫菌作饵料，处于稳定期的细胞几乎没有饵料价值。根据个别培育法的结果来看，采用处于对数增殖期的桃红荚硫菌浓度为 3.5×10^6 细胞/毫升，能获得轮虫实际种群增长率(r)和净繁殖率(R_0)的最高值。但这比单纯用小球藻作饵料所得到的最高值(r : 0.88, R_0 : 20.0)还是相当低的。变化桃红荚硫菌的浓度研究其饵料价值的实验证明，用桃红荚硫

菌作饵料的最适浓度是 $10^6 \sim 10^7$ 细胞/毫升。

实验结果表明，在桃红荚硫菌中混以面包酵母能起到互补作用，比单纯投喂的饵料价值有所提高。在混入小球藻的实验中，尽管小球藻的混入比例很低，但其补充效果却很显著，按照个别培育法所得出的两个指标值均接近于单纯投喂小球藻的最高值。

凡此种种，尽管桃红荚硫菌本身不具备完全的饵料价值，但可以作为能源进行甚为有效的利用。在贝池维持轮虫高度生产的大概不仅仅是光合成细菌，还依靠其它微细藻类和细菌类起补充作用。事实证明，成批培养轮虫，当海产小球藻不足时，可以用桃红荚硫菌作补充饵料。

从添加各种营养素的效果看来，轮虫明显地需要维生素A。关于其它的脂溶性维生素类，由于添加浓度过高，其效果不明显。今后需进一步进行低浓度的实验，并探讨其添加效果。

(吕元元译自《长崎大学水产系研究报告》，1983年2月，第54号。张主言校)