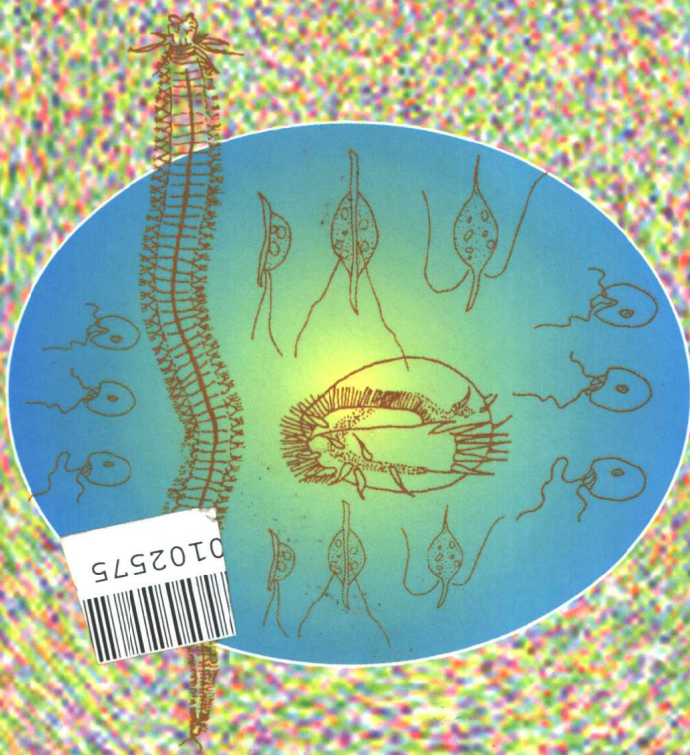


生物饵料 培养技术

李庆彪 宋全山 编著



中国农业出版社

现代养殖技术丛书
生物饵料培养技术

李庆彪 宋全山 编著

* * *

责任编辑 林维芳

中国农业出版社出版(北京市朝阳区农展馆北路2号 100026)
新华书店北京发行所发行 中国农业出版社印刷厂印刷

787mm×1092mm 32开本 7.75印张 170千字

1999年6月第1版 1999年6月北京第1次印刷

印数 1~5 000册 定价 10.80元

ISBN 7-109-05772-0/S·3750

(凡本版图书出现印刷、装订错误,请向出版社发行部调换)

生物饵料是从天然水域中，人工筛选出来的饵料生物。由于其具有营养丰富，不败坏水质，便于水产动物摄食和消化吸收等优点，至今难以用人工配合饲料所取代。因此，生物饵料在水产动物苗种生产中，具有举足轻重的作用。

80年代以来，我国的水产养殖事业取得了迅速发展。同时，水产动物人工育苗也逐渐走向企业化生产。与水产动物育苗生产相配套的生物饵料的培养就显得越来越重要。生物饵料能否在质量、数量和种类上满足水产动物育苗的需要，往往成为育苗生产中的突出问题。由于饵料培养中有自然因素的影响，也有培养设备方面的原因，但主要是在培养技术上存在盲目性，妨碍了发展生物饵料培养。近20年来，我国在生物饵料，特别是单细胞藻饵料的培养方面，取得了很多研究成果，并在生产实践中，得到了正确的运用。为此我们收集了大量有关生物饵料方面的资料，并吸收了国内外

的最新研究成果，结合自己的研究成果和生产实践经验，从三方面：植物性生物饵料的培养；动物性生物饵料培养；光合细菌的培养，向读者介绍。

刘翠红同志帮助整理资料并参加部分内容的编写，特此致谢。

由于作者水平所限，可能有不当之处，欢迎批评指正。

编 者

1998年12月

前言

第一章 光合细菌的培养	1
一、光合细菌的生物学	2
二、光合细菌的培养设备与培养基	5
三、菌种的分离、培养与保存	10
四、光合细菌的大量培养	16
第二章 植物性生物饵料的培养	20
一、浮游单细胞藻的培养	20
(一) 常用浮游单细胞藻的形态特征与生态习性	20
(二) 浮游单细胞藻的繁殖特点与运动方式	28
(三) 影响浮游单细胞藻生长繁殖的主要生态因子	33
(四) 浮游单细胞藻的培养液	58
(五) 厂房与设备	64
(六) 培养用水的处理方法	70
(七) 培养容器、用具的消毒处理方法	79
(八) 分级培养	80
(九) 封闭式培养	105
(十) 提高产量的途径和方法	113
(十一) 计划管理	118

(十二) 敌害生物的防治	121
(十三) 浓缩贮存	129
(十四) 浮游单细胞藻的计数方法	137
二、底栖硅藻的培养	139
(一) 厂房与设备	139
(二) 藻种来源	140
(三) 培养方法	141
三、螺旋藻的培养	146
(一) 螺旋藻的形态特征和生态习性	147
(二) 培养方法	151
第三章 动物性生物饵料的培养	159
一、轮虫的培养	159
二、卤虫的培养	177
三、桡足类的培养	193
四、枝角类的培养	203
五、沙蚕的培养	211
六、摇蚊幼虫的培养	221
参考文献	234

光合细菌的培养

光合细菌是可以利用光能进行光合作用生长发育的微生物。它与绿色植物、藻类及其他营光合作用的生物的不同点在于，光合细菌的光合作用仅在厌氧的光照条件下进行，而且不产生氧气。光合细菌广泛分布于水田、沼泽、河流、海洋及活性污泥和土壤中。特别是在被有机质污染的水体中，每1克风干土中光合细菌的含量高达 $10^4 \sim 10^6$ 个^[2]。被有机质污染的污水在自然净化过程中，一般先是异养微生物大量繁殖，把高分子的碳水化合物、蛋白质、脂肪等分解成低分子有机物，随后光合细菌大量出现。这是因为光合细菌利用这些低分子有机物迅速增殖。最后是藻类和浮游植物大量出现。因此，可以用人工方法大量培养光合细菌处理污水，加快水质净化。

光合细菌的营养非常丰富，蛋白质含量一般在57%以上，所含氨基酸种类比较齐全，B族维生素的含量极为丰富，还含有辅酶Q等活性物质^[1]。因此，光合细菌是鱼、虾、贝类幼体的优良饵料，也是轮虫、枝角类等的优良饵料。但是光合细菌的高度不饱和脂肪酸含量甚少，作为饵料应予以注意。总之，由于光合细菌净化水质的功能和丰富的营养价值，作为生物饵料在水产养殖上已得到广泛应用。

一、光合细菌的生物学

(一) 光合细菌的形态特征与光合色素 光合细菌的革兰氏阴性细菌。菌体的形态多种多样，有球形、杆状、卵圆形及螺旋形等。有的球形还有突起，细胞外形轮廓显得不规则。但是各个种仍具有一定的形态特征。如球形红假单孢菌的形态为球形，绿突菌属为具突起的球形。有的光合细菌具有极生鞭毛，这种光合细菌一般都运动，但也有的以滑行方式运动。

光合细菌细胞大小因种类而异。红螺菌科的细胞大小为 $0.6\sim 0.7$ 微米 $\times 1\sim 10$ 微米，着色科的细胞大小为 $1\sim 3$ 微米 $\times 2\sim 15$ 微米，绿杆菌科的细胞大小为 $0.7\sim 1$ 微米 $\times 1\sim 2$ 微米，绿色丝状菌科的细胞大小可达 300 微米^[4]。

光合细菌的光合色素有细菌叶绿素（菌绿素）和类胡萝卜素两大类。细菌叶绿素有 5 种，分别称为细菌叶绿素 a、b、c、d、e，各自有固定的吸收光谱。由于光合色素的组成和数量不同，培养液往往呈现不同的颜色。类胡萝卜素也是构成光合色素的重要成分。它的作用是将光能传递给细菌叶绿素，并能起氧化保护剂的作用，保护细菌叶绿素免受强光伤害。类胡萝卜素还能以其组成成分和数量影响吸收光谱的波长，对菌体呈现的颜色起决定性的作用，能使色硫菌科的光合细菌呈现褐色、粉红色、紫红色、紫色或橙色，能使绿硫菌科的光合细菌呈绿色，使红硫菌科的光合细菌呈黄色到紫色的各种鲜艳颜色。

光合色素的含量受光照强度的影响。在光照强度较高的条件下培养，细菌叶绿素含量则低；在光照强度较低的条件

下培养，细菌叶绿素含量则高。类胡萝卜素的含量通常受细菌叶绿素含量的调节。氧对光合色素的合成具有明显的抑制作用。在有氧条件下培养，细菌叶绿素和类胡萝卜素都不产生，故在有氧黑暗条件下培养菌体是无色的。氧对光合色素合成的抑制作用，随着氧的消除而消失。再置于缺氧有光条件下培养，细菌叶绿素和类胡萝卜素又重新产生。

(二) 光合细菌的生态特点 光合细菌在弱光环境中生长繁殖快。光照强度太大能对细菌叶绿素造成伤害。适宜光照强度为 1000~2000 勒克斯^[1]。光合细菌对光质还有一定的要求。大多数光合细菌利用波长 700~900 纳米近红外区的光。例如，红螺菌科的细菌在波长 375 纳米、400~500 纳米和 810~890 纳米有吸收高峰，也就是说对以上三个波长范围的光吸收利用能力强。因此在选用人工光源时，要包括上述范围的波长。由于荧光灯缺乏波长较长的红外线，故不能采用。应采用钨丝灯泡作为人工光源。

光合细菌需要缺氧的生态环境。如果氧气充足，则抑制其对光合色素的合成，不利于生长。

光合细菌进行光合作用，不需要水作供氢体，而是以 H_2S 或有机物等作供氢体。因此，光合细菌多生活于各种水域的活性污泥中和被有机质污染的水体中。这是因为这些地方有机质丰富，含氧量很低，并且有一定数量的硫化物以及被异养菌分解成的低分子有机物存在，而且光照较弱，光穿过水层到达底层波长较长。这样的生态环境为光合细菌的生长繁殖提供了非常有利的条件。

光合细菌的最适 pH 为 6~8。最适培养温度为 20~30℃^[3]。

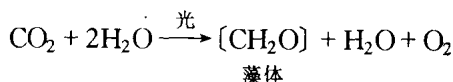
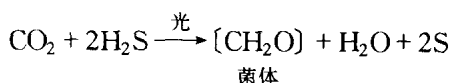
(三) 光合细菌的繁殖方式 光合细菌的繁殖方式分为

三种。一种是二分裂繁殖。绝大多数光合细菌都是二分裂繁殖。另一种是出芽分裂繁殖。繁殖时母细胞于鞭毛的相对极处产生纤细的管，管末端膨大形成芽体，子细胞与母细胞同样大小，两者又发生不同步分裂，结果形成玫瑰花簇的细胞丛。如沼泽红假单胞菌。还有一种繁殖方式是极性伸长分裂，见于着色菌科的泥网硫杆菌属^[4]。

(四) 光合细菌对营养的要求

1. 光合细菌的碳源 光合细菌有的能利用 CO_2 作碳源，有的能利用有机物作碳源。根据光合细菌对碳源的利用不同，可以分为以下三种营养类型。

(1) 光能自养型 光能自养型光合细菌以 CO_2 为主要碳源，以 H_2S 作供氢体。如着色菌科和绿菌科的细菌。与藻类植物的不同点在于，藻类植物是以 H_2O 作供氢体。



(2) 光能异养型 光能异养型光合细菌是以各种有机物作为碳源，同时也以有机物作为供氢体。如红螺菌科的细菌。它和藻类植物的不同点在于，不仅供氢体不同，碳源也不同。

(3) 兼性营养型 兼性营养型光合细菌既能利用 CO_2 作碳源，也能利用有机物作碳源，如绿色丝状菌科的细菌。

2. 光合细菌的氮源 光合细菌的氮源较广，可以利用铵盐、氨态氮作氮源，有的还能利用硝酸盐和尿素作氮源。许多紫细菌甚至能固定氮。

3. 光合细菌对维生素的要求 光合细菌常常需要维生素作为生长因子。据报道, 球形红假单胞菌需要硫胺素(B_1)及尼克酸(B_5), 胶质红假单胞菌需要生物素(B_7), 沼泽红假单胞菌需要对氨基苯甲酸, 荚膜红假单胞菌需要硫胺素, 深红红螺菌需要维生素 B_{12} 等。在培养时通常加入0.2%的酵母膏或0.01%~0.02%的复合维生素B^[1]。

二、光合细菌的培养设备与培养基

(一) 培养设备 光合细菌的培养设备包括灭菌设备、培养容器、培养用具和检测仪器。

1. 灭菌设备 主要有高压蒸汽灭菌锅和烘箱两种。前者用于高压湿热灭菌, 后者用于高温干热灭菌。

2. 培养容器

试管: 规格为直径15毫米×160毫米。主要用于液体培养和斜面培养。

培养皿: 规格为直径6~10厘米。用于制作平板培养基, 分离菌种。

三角烧瓶: 规格为100~5 000毫升。用于扩大培养。

细口瓶: 规格5 000~20 000毫升。用于扩大培养和生产性大量培养。

塑料薄膜袋: 用于生产性大量培养。

大型塑料水槽: 一般为圆柱形。容量为300~500升, 用于生产性大量培养。

3. 培养用具

无菌接种箱: 用于菌种的分离和接种。

恒温培养箱: 主要用于培养菌种。箱内必须带有钨丝灯

泡的人工光源。

电冰箱：主要用于菌种和某些有机试剂的保存。

此外，还有移液管（1~10 毫升）、分液漏斗、接种环、酒精灯及控温设备和充气设置。

4. 检测仪器

分光光度计：用于测定光合细菌的密度。

酸度计：用于测定培养液的 pH。

显微镜：用于菌种的观察和检查。

(二) 培养基 培养基是培养的光合细菌生活的场所，是其赖以生长繁殖的物质基础，因此，必须满足光合细菌的生理和营养需要。对于不同营养类型的光合细菌应使用不同的培养基。对于光能自养型光合细菌，一般用几种无机盐为基础培养基，加入适量的碳酸盐作为 CO_2 的来源，用 H_3PO_4 把 pH 调整到 7.0~8.0，然后加入 0.05%~0.1% 的 $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 作为电子供体和供氢体。对于异养型光合细菌，一般用 0.1% NaCl 、0.05% KH_2PO_4 和 0.02% MgSO_4 作基础培养基，再加入 0.2% 酵母膏、0.25% 乙酸钠、0.02% 丙酸钠。用 5% 的 NaHCO_3 把 pH 调节到 7.0~8.0⁽¹⁾。此外，根据培养的种类，培养基用淡水或海水配制。

下面是几种常用的培养基配方。

1. 小林达治 (1977) 培养基 主要用于富集培养。

(1) 红螺菌科用

NH_4Cl	1.0 克
NaHCO_3	1.0 克
K_2HPO_4	0.2 克
CH_3COONa	1~5 克
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 克

NaCl	0.5~2.0 克
微量金属元素 (T.m.) 贮液	10 毫升
生长素辅助因子贮液	1 毫升
蒸馏水	1 000 毫升
pH	7.0

其中 NaHCO_3 需事先制成 5% 的水溶液, 经过滤除菌后取 20 毫升与另外高压灭菌的培养基混合。

微量金属元素 (T.m.) 贮液配方如下:

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 毫克, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.05 毫克, H_3BO_3 1 毫克, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.05 毫克, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 毫克, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.5 毫克, 蒸馏水 1 000 毫升。

生长素辅助因子贮液配方如下:

维生素 B_1 、菸酸、P-胺基苯甲酸、生长素等数毫克到数十毫克, 蒸馏水 1 000 毫升。

如果培养的光合细菌是海水种, 则将蒸馏水改为海水。

(2) 着色菌科用

NH_4Cl	1.0 克
NaHCO_3	1.0 克
K_2HPO_4	0.5 克
Na_2S	1.0 克
MgCl_2	0.2 克
微量金属元素 (T.m.) 贮液	10 毫升
蒸馏水	1 000 毫升
pH	8.0~8.5

(3) 绿杆菌科用

NH_4Cl	1.0 克
NaHCO_3	1.0 克

K_2HPO_4	0.5 克
$Na_2S \cdot 9H_2O$	1.0 克
$MgCl_2$	0.2 克
微量金属元素 (T.m.) 贮液	10 毫升
蒸馏水	1000 毫升
pH	7.3

2. Sawad 培养基 (1975) 用于荚膜红假单孢菌的培养。

CH_3COONa	1.0 克
(或丙酸钠 1.0 克)	
酵母膏	1.0 克
(或组氨酸, 或谷氨酸 0.1 克)	
NH_4Cl	1.0 克
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.4 克
$NaCl$	1.0 克
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.5 克
$NaHCO_3$	0.3 克
KH_2PO_4	1.0 克
微量金属元素 (T.m.) 贮液	1 毫升
生长素贮液	10 毫升
蒸馏水	1 000 毫升

其中微量金属元素 (T.m.) 贮液配方如下:

EDTA 2.5 克, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 10.95 克, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 1.54 克, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.39 克, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.2 克, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 7.0 克, 蒸馏水 1 000 毫升。

生长素贮液配方如下:

生物素 1 毫克, 烟酸 (尼克酸) 100 微克, 对氨基苯甲

酸 10 毫克, 维生素 B₁ 100 毫克, 蒸馏水 1 000 毫升。酵母膏和生长素贮液二者有一即可。

3. RcvBN 培养基 (1975) 用于富集培养、分离和保存菌种。

DL 苹果酸	4 克
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 克
K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄ 缓冲液	10 毫升
尼克酸	1 毫克
生物素	15 微克
微量金属元素 (T.m.) 贮液	1 毫升
MgSO ₄ ·7H ₂ O	120 毫克
CaCl ₂ ·2H ₂ O	75 毫克
EDTA	20 毫克
维生素 B ₁	1 毫克
蒸馏水	1 000 毫升
pH	6.8

其中微量金属元素 (T.m.) 贮液配方如下:

H₃BO₃ 0.7 克, MnSO₄·H₂O 398 毫克, Na₂MoO₄·2H₂O 188 毫克, ZnSO₄·7H₂O 60 毫克, Cu (NO₃)₂·3H₂O 10 毫克, 蒸馏水 250 毫升。

4. 矢木修身培养基 (1977)

CH ₃ COONa	3 克
CH ₃ CH ₂ COONa	0.3 克
KH ₂ PO ₄	0.5 克
K ₂ HPO ₄	0.5 克
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 克
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.3 克

CaCl ₂ ·6H ₂ O	0.05 克
NaCl	0.1 克
酵母膏	0.05 克
蒸馏水	1 000 毫升

5. Van Niel 培养基 (1944) 用于富集培养。

(NH ₄) ₂ SO ₄	1 克
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 克
NHCO ₃	5 克
K ₂ HPO ₄	0.5 克
蛋白胨	2 克
海水	1 000 毫升

三、菌种的分离、培养与保存

(一) 菌种的分离 要培养光合细菌，首先要有菌种。菌种可以从别的单位获得。如果别的单位没有适合的菌种，就要从自然生态环境中分离。分离菌种的工作要求虽然比较高，但也并非高不可攀，只要按照要求操作，就能分离出需要的菌种。菌种的分离步骤如下：

1. 采样 要根据光合细菌的生态特点，选择光合细菌大量分布的地方采样。目前水产养殖业使用的光合细菌主要是红螺菌科的一些种类。这些光合细菌是以有机质作为光合作用的碳源和供氢体。因此，多分布于河流、湖泊、海洋的底泥及水田、沟渠的底泥中。污水池塘等有机质含量丰富的地方，分布数量较大。淀粉厂、食品厂等排放的废水中，因含有大量有机质，在排水沟中，光合细菌的分布数量也较大。在以上这些地方都可以采集样品。

采样是用采泥器采集底泥。如果水很浅，也可以不用采泥器。采集到的底泥连同水一起放入广口瓶中带回。

2. 富集培养 采集的样品中光合细菌的数量一般较少，并且含有不少杂菌，难以直接进行分离，必须进行富集培养。所谓富集培养，就是为要分离的光合细菌提供适宜的培养基与培养条件，使其大量增殖。同时抑制杂菌的生长。富集培养的培养基均采用液体培养基。红螺菌科细菌富集培养的培养基配方常采用 Van Niel 培养基。如果再加入 0.2% 的酵母膏，则能促进其增殖。

除了培养基之外，还要给培养物制造缺氧的培养环境。为此，先将采集的样品装入大型试管或具塞磨口瓶中，再加入预先配制好的液体培养基，充分搅拌，使样品与培养基充分分散混合，然后在试管中加入液体石蜡，隔绝空气，防止空气中的氧溶解于培养基中。如果用具塞磨口瓶，则要加满培养液，盖上瓶塞，让多余的培养液从瓶口溢出，瓶内不能有气泡存在。瓶口套上塑料薄膜，用橡皮筋扎紧。

为了加快光合细菌的增殖，还要提供适宜的培养条件。除了缺氧的环境之外，适宜的温度和光照强度也很重要。培养温度一般为 25~30℃，光照强度为 1 000~2 000 勒克斯，最好 1 天 24 小时连续光照。经过 2~6 周培养，在培养容器的内壁逐渐出现光合细菌菌落，培养基也逐渐变为红色。一般地说，海水光合细菌比淡水光合细菌生长缓慢，故富集培养的时间也长。

在培养容器内的培养基变为红色后，用移液管吸取菌液，接种到另外的大型试管或具塞磨口瓶中，加入培养基，按前述的方法和条件继续培养。如此经过几次接种培养，由于培养条件更适宜光合细菌的生长繁殖，光合细菌大量增