

# 藤壶 (*Balanus amphitrite amphitrite* Darwin.) 幼虫室内培养条件的研究

刘健 何进金 于久芬 王永元

(中国科学院海洋研究所)

## 一、前言

藤壶属于节肢动物门,甲壳纲,蔓足目。它附着于海洋中各种设施及船体表面营固着生活。由于生活力强,繁殖快,分布广,因而成为附着生物中危害最严重的类型之一。藤壶的危害必须通过其幼虫的附着阶段。研究藤壶幼虫的附着机制及防除机制就必然成为改进附着生物防除方法及探索新的有效的防除方法的基础。研究附着及防除机制时,要求在实验室内做细致的观察与实验,室内大量培养藤壶幼虫供实验,就成为解决这一问题的关键。

藤壶幼虫破膜而出之后即为无节幼虫。无节幼虫分为6期,经6次脱皮,变态后成为金星幼虫,金星幼虫附着变态后即成为小藤壶<sup>(1), (4-7)</sup>。防除研究所需要的是藤壶的金星幼虫。

藤壶幼虫的培养,最初是为了形态学和发生学上的目的而进行的。Bassindal (1936) 曾用 *Nitzschia* 为幼虫饵料,培养 *Verruca Stroemia* 至金星幼虫,而未能变态附着,培养 *Balanus balanoides* 及 *Chthamalus Steiialus* 分别至无节 V、VI 期<sup>(5)</sup>。藤永元作者 (1941) 又用 *Skeletonema costatum* 为饵料,培养 *Balanus amphitrite hawaiiensis*、*B. amphitrite albicostatus* 至变态附着<sup>(3)</sup>。Cottlow 等 (1957—1958) 用 *Chlamydomonas* sp. 与受精的 *Arbacia punctutata* 卵为饵料,培养 *Balanus eburneus* 至变态附着者,占总培养数121个的16.3%;培养 *Balanus amphi-*

*trite denticulata* 至变态附着者,占总培养数12.7%<sup>(7)</sup>。Moyse (1960) 为了防除试验的目的,也用 *Skeletonema costatum* 培养 *Elminius modestus* 至变态附着。虽然变态附着的比数较前人高,但培养幼虫的总数较少,同时,对于培养幼虫所需条件仍未能提供足够的资料<sup>(10)</sup>。在室内能较成功地培养大量金星幼虫提供防除试验用的是 Freiburger 等 (1966), 他们曾较大量培养过 *Balanus balanoides* 至金星幼虫,但成活率也只达到55%。国内,吴尚勳等 (1963) 在这方面也做过不少工作,曾用绿枝藻的孢子等培养 *Balanus amphitrite amphitrite* 的幼虫至变态附着,但也未达到稳定、重复和成活率高的要求。

本项工作针对上述情况,试图通过对培养条件的探索彻底解决室内藤壶幼虫的大量培养问题。

## 二、材料与方 法

实验材料采用青岛海区船底附着最严重的纹藤壶, (*Balanus amphitrite amphitrite* Darwin.) 藤壶成体由青岛中港采回后,经解剖,取出其已成熟的褐色卵块,置于盛有海水的烧杯中,1—2小时后,即可孵化为无节幼虫。它具有强烈的趋光性,借此,将幼虫移入盛有新鲜海水的玻璃缸中进行实验。

培养缸为15×10×15厘米。每缸各加过滤海水1,000毫升。其盐度为29‰。每缸加幼虫1,000个,即平均每毫升海水中有幼虫一个。加幼虫时,先吸出搅均后的幼虫一毫升,逐个

计数, 然后按计算量加入应加的总毫升数即可。

培养是在无光的恒温箱中进行, 温度变动范围一般为 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。进行饵料种类及饵料密度实验时, 水温控制在 $27^{\circ}\text{C}$  (与青岛海区该种藤壶大量繁殖时之自然水温一致)。进行适温培养实验时, 水温控制为 $10^{\circ}\text{C}$ 、 $15^{\circ}\text{C}$ 、 $20^{\circ}\text{C}$ 、 $25^{\circ}\text{C}$ 、 $30^{\circ}\text{C}$ 、 $35^{\circ}\text{C}$ 、 $40^{\circ}\text{C}$ 七组。进行水质因子的实验时, 温度控制为 $30^{\circ}\text{C}$ 。以上各组实验都有并行两缸。

各培养缸每隔24小时, 换新鲜海水一次, 利用无节幼虫的趋光性, 将幼虫用吸管移入另外培养缸中, 并添加饵料, 添加的数量, 先以血球计数器计数饵料原液浓度, 经换算, 按求量加入。同时检查其幼虫培养情况, 检查下列指标:

**死亡率:** 以计数尚活的和已死的幼虫个数求得, 计数活幼虫个数所采用的方法与加入幼虫时所采用的方法是相同的。

**生长速度:** 在显微镜下以目微尺量10个个体的体长, 取其平均值, 同时记录其期数。

**胃肠情况:** 在显微镜下观察胃肠颜色, 饱满情况、消化情况等。以及达到金星幼虫所需的天数。

### 三、实验与结果

#### (一) 藤壶幼虫最适饵料种类与饵料的适宜密度

培养海洋无脊椎动物幼虫的饵料种类繁多, 尤其在双壳类幼虫的培养中, 试用的种类更多<sup>[11, 12]</sup>, 考虑到饵料培养的简易及不同饵料的特性, 本实验采用了三种不同类型的单胞藻为饵料: 青岛大扁藻, (*Platymonas helgolandica* Kylin Var.) (*Tsingtaoensis* Tseng et T. T. Chang var. nov.), 盐藻 (*Dunaliella* sp.) 和褐枝藻 (*Phalodactylum Tricornutum*)。

使用上述三种饵料培养藤壶无节幼虫时, 分为单一投放及混合投放两类, 共6组。每组

投放密度又分为5种。混合投放时, 每种饵料各占总数 $1/2$ 。

经过培养观察获得如下的结果:

1. 不论是单一饵料还是混合饵料, 投放密度为1,000个细胞/毫升(个幼虫)/天或10,000个细胞/毫升(个幼虫)/天时, 都很难将无节幼虫培养至金星幼虫阶段。其中以单独投放扁藻者结果为最佳, 但投放密度为1,000个细胞/毫升(个幼虫)/天时, 也只能培养至无节幼虫Ⅲ期, 密度为10,000个细胞/毫升(个幼虫)/天时, 能培养至无节幼虫Ⅴ期, 但变态成为金星幼虫者极少。

2. 饵料投放密度和各组培养结果如下表。

从表中分析可得下列结果:

(1) 扁藻是藤壶无节幼虫的优良饵料。在培养水温为 $27^{\circ}\text{C}$ 时, 扁藻投放密度为5万—10万个细胞/毫升(个幼虫)/天时, 都能顺利地将无节幼虫培养为金星幼虫, 各次实验达到金星幼虫者都在95%以上。扁藻投入密度10万个细胞/毫升(个幼虫)/天时为最适宜。在这一密度下培养4天, 无节幼虫即可变态为金星幼虫。

(2) 盐藻与褐枝藻都不是幼虫的适宜饵料。二者单独投放或者混合投放, 经过多次实验, 不论其密度为5万、10万、20万, 培养达到金星幼虫都很少超过无节幼虫总数的10%, 有时甚至到无节幼虫Ⅴ期即全部死亡。

(3) 从含有扁藻的各组混合饵料培养中, 也可证明扁藻确为无节幼虫的良好饵料, 而盐藻和褐枝藻则相反。凡投放含有扁藻的混合饵料者, 都能大量地培养出金星幼虫。生长、变态速度视所含扁藻之密度而定, 一般与单投放扁藻时之相同密度相等, 不因其中添加了硅藻或盐藻而有所增速。如扁藻加盐藻, 密度为20万个细胞/毫升(个幼虫)/天时(其中扁藻为10万), 无节幼虫开始及全部变为金星幼虫的时间与单独投放扁藻10万个细胞完全相同。这就证明了, 在混合饵料中只有扁藻是起作用的, 而盐藻是无效的。

饵料种类、密度与藤壶幼虫生长变态速度的关系

饵料种类	饵料密度 (个细胞/ 毫升/天)	培养不同时间后无节幼虫之体长(μ)					
		一天	二天	三天	四天	五天	六天
扁藻	50,000	360	415	502	558	50%金星幼虫	
扁藻	100,000	372	539	539	50%金星幼虫		
扁藻	200,000	378	527	527	30%金星幼虫		
盐藻	50,000	329	391	391	446	447	50%死亡
盐藻	200,000	353	446	446	471	2%金星幼虫	5%金星幼虫
砂藻	50,000	353	378	378	30%死亡	全死	(50%以上死亡)
砂藻	100,000	341	397	397	397	全死	
砂藻	200,000	341	391	391	403	490	全死
扁+盐	50,000	372	515	515	564	50%金星幼虫	
扁+盐	100,000	372	533	533	25%金星幼虫	80%金星幼虫	
扁+盐	200,000	384	546	546	50%金星幼虫		
扁+砂	50,000	335	471	471	521	30%金星幼虫	
扁+砂	100,000	329	484	484	521	50%金星幼虫	
扁+砂	200,000	329	471	471	30%金星幼虫	80%金星幼虫	
盐+砂	50,000	353	366	366	428	50%死亡	
盐+砂	100,000	372	397	397	422	50%死亡	
盐+砂	200,000	366	415	415	515	502	30%死亡
对照	不投饵	322	322	322	全部死亡		0.5%金星幼虫

注：一般有50%变态为金星幼虫后，再经24小时90%以上都可变态，一般有30%—50%死亡后，再经24小时其余全部死亡。

### (二) 藤壶幼虫的培养适温

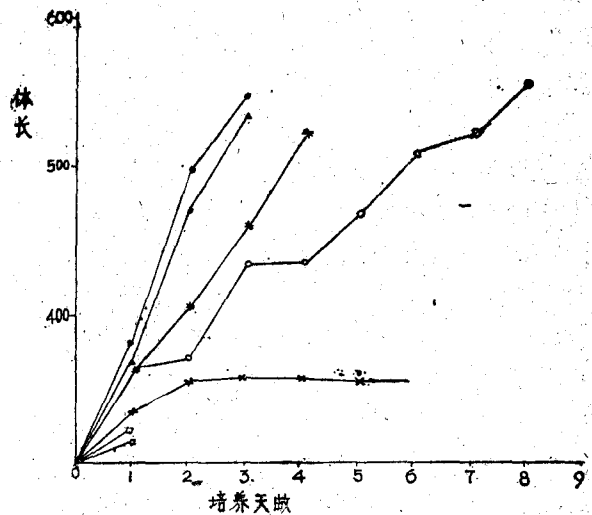
本实验是采用了上述实验提供的最有利条件下进行的，各不同温度组别的实验，即除温度不同之外，各组都以扁藻为饵料，投放密度为10万个细胞/毫升(个幼虫)/天，同时每天换新鲜海水一次，并添加饵料，结果如右图所示。

从曲线及观察结果可以看出：

40℃及10℃分别是藤壶幼虫存活的高低临界温度。高于40℃及低于10℃，幼虫都不能生长，一般在24小时左右即会全部死亡。

15℃是变态的临界低温。虽然在短时间内不至于全部死亡，甚至还可以脱皮，但活动力甚弱，最终不能变态成金星幼虫。六、七天之后即全部死亡。

在20℃时，无节幼虫的生长非常缓慢，体长也很不一致，到后期时，其死亡率增大，培



温度与藤壶幼虫生长、变态、速度的关系，符号：□...40℃、·...35℃、▲...30℃、\*...25℃、○...20℃、×...15℃、◇...10℃

养八天后才能达到金星幼虫阶段，死亡率较高及变态缓慢，说明了这一温度作为培养温度是过低的。

培养温度为25℃、30℃、35℃时，幼虫游动活泼，生长变态较快，能变态为金星幼虫者都不低于95%。30℃与35℃时，仅只培养4天即可变态为金星幼虫。虽然二者生长与变态的速度基本相同，但考虑到，一方面30℃时已达幼虫变态最快的速度，另一方面35℃接近于高临界温度40℃，因此，应选取30℃为藤壶幼虫培养的最适温度。

### (三) 水质条件对藤壶幼虫生长、变态的影响

过去的研究者，曾提到在培养藤壶幼虫的过程中勿须换水<sup>[1]、[10]</sup>。当然，换水与否与单位水体中放养幼虫的个数是有直接关系的，但为了防除试验，要求提供数量较多的金星幼虫的前提下，放养密度太稀势必会造成很多困难。我们曾在上述的优良培养条件下（每培养缸中加海水1,000毫升，无节幼虫1,000个，扁藻为饵料），进行了换水与不换水的对比实验，结果证明，在无节幼虫Ⅵ、Ⅶ期之前，二者之生长速度基本上是一致的，也都没有死亡。但换水者能够顺利地通过无节幼虫Ⅵ期变态为金星幼虫，变态的比数在95%以上；而不换水者，Ⅶ期之后即开始有死亡的，能变态为金星幼虫的不超过30%。

我们在“海水中Ca<sup>++</sup>的浓度对藤壶附着及生长的影响”一文中曾提到，在自然海水条件下，Ca<sup>++</sup>的渗出率维持于9.5mgCa<sup>++</sup>厘米<sup>2</sup>/天的情况下，能够大大地吸引藤壶的附着。吴尚勳等（1965）曾证明Fe<sup>+++</sup>的浓度维持于每升0.404mg Fe<sup>+++</sup>时，能提高对虾幼苗的成活率。这些结果启示我们进行了不同的Ca<sup>++</sup>与Fe<sup>+++</sup>浓度对藤壶幼虫生长及变态影响实验。实验同样是在上述各实验所证实的最优条件下进行的，即每缸1,000毫升海水，无节幼虫1,000个，扁藻投放密度为每天每毫升10万个细胞，每天换一次新鲜海水，水温控制于30℃。

不同Ca<sup>++</sup>浓度的海水是在过滤海水中加入不同量的CaCl<sub>2</sub>(C.P.)蒸馏水母液而成。Ca<sup>++</sup>的添加浓度每升从50—400mgCa<sup>++</sup>的范畴内共分成八组。在上述浓度下，各组实验结果与对照基本一致。显然，Ca<sup>++</sup>添加对藤壶幼虫的生长与变态是没有什么显著效果的。

不同Fe<sup>+++</sup>浓度的海水是在过滤海水中加入不同量的FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O(C.P.)蒸馏水母液而成，Fe<sup>+++</sup>的添加浓度每升0.025—5.00mg Fe<sup>+++</sup>共分十组。结果证明Fe<sup>+++</sup>为0.10或0.25mg在每升水中，能加速无节幼虫变态，比对照组可提前半天到一天变态，使培养期缩短为三天，Fe<sup>+++</sup>高于0.25或低于0.10mg时，均无明显的促进作用。

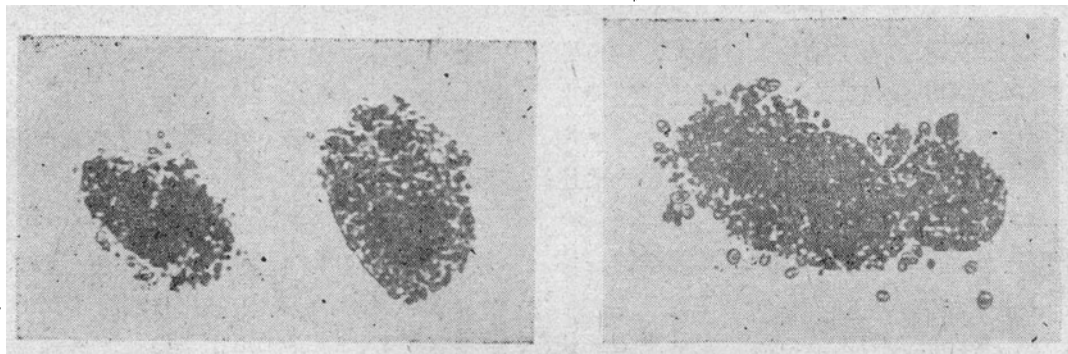
## 四、讨 论

上述实验清楚地表明了大量培养藤壶幼虫成功的关键是饵料、温度、与水质条件。其中以选取适当的饵料种类和饵料密度更为重要。

在进行了三种不同类型的单胞藻为藤壶无节幼虫的饵料实验后，证明扁藻是无节幼虫的优良饵料。扁藻之所以能够成为其优良饵料，最主要的是无节幼虫能够消化其吞食的扁藻，并且扁藻的营养成分适合幼虫的需要。从显微镜下观察幼虫的粪便，可以证明，粪便之外形为椭圆形，用玻璃针搅碎后，可看到已被消化为粘糊状，已没有完整的扁藻细胞（图1），其次，扁藻的游泳能力强，本身不易沉底，易被幼虫摄取。无节幼虫对盐藻的消化能力是很低的，从幼虫粪便的观察中可以看出，粪便是完整的盐藻细胞，并相当多（图1），同时以盐藻培养的无节幼虫能变为金星幼虫者也很少超过10%（图2）。

褐枝藻与盐藻相似，虽然能被幼虫大量吞食，但无节幼虫难于变态为金星幼虫，另外硅藻也不大适宜，因不能游动易于沉底。

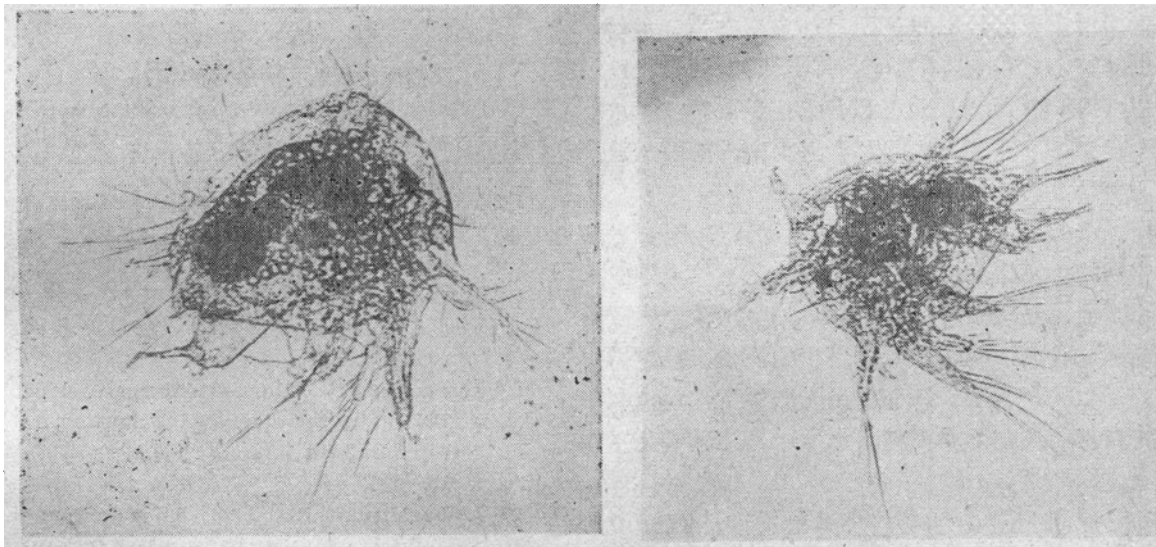
除了选择适宜饵料种类之外，还必须注意投放密度，过高或过低对于变态都有影响。过



摄取扁藻后的粪便

摄取盐藻后的粪便

图1 纹藤壶无节幼虫的粪便



用扁藻培养，胃肠饱满，脱皮快，变态率95%以上。用盐藻培养，胃肠饱满，脱皮慢，变态率不超过10%。

图2 纹藤壶无节幼虫24小时培养后情况

低不能充分满足幼虫的需要。过多时对水质不利。投放密度以每天每毫升10万个细胞为最适宜。摄食情况如下表：

藤壶幼虫的摄食量

培养时间	投饵料·个细胞/毫升/天	摄食量·个细胞/毫升/天	剩余量·个细胞/毫升/天
第一天	10万	2.8万	7.2万
第二天	10万	4.7万	5.3万
第三天	10万	7.8万	2.2万

不同期幼虫的摄食量是不同的，越后期其摄食量越大，变态前一天的摄食量增至7.8万，如投饵量低于10万细胞则很难保证幼虫的需要。幼虫摄食量如此之高是值得注意的，否

则，饵料的种类虽适宜，密度不够，也不能保证培养出金星幼虫的高变态率。

培养温度在25℃—35℃之间，饵料适宜时，无节幼虫几乎都能变态为金星幼虫。在25℃时，一般达到金星幼虫的时间都需要六天，这一温度与青岛海区该种藤壶大量繁殖时之温度基本是一致的，六天是正常变态的最低需要时间。30℃时，达到金星幼虫的时间只需要四天，可见适当升高温度能够促进无节幼虫的生长与变态。因此温度是决定培养期长短的重要条件。

水质条件对藤壶无节幼虫的生长变态有明显影响。每天换水能使幼虫变态率达到最高的比数。经常换新鲜海水能够将藤壶幼虫的大量

粪便以及其它代谢产物及时清除；可避免由于饵料或幼虫带入之原生动物大量繁殖，以至影响幼虫之正常生长与变态。应特别注意不换水引起的不良后果是累积的，在无节幼虫、V期之前虽不易发现，但到Ⅵ期或变态时就会明显地显示出来，使成活率大为降低。因此，每天换新鲜海水是提高变态率达到最高比数的重要条件。

Ca<sup>++</sup>各种浓度的实验，对藤壶幼虫之生长与变态没有显著的促进作用，这可能是由于自然海水中所含Ca<sup>++</sup>的浓度很高，足够幼虫正常代谢所需要的，同时无节幼虫变态为金星幼虫的整个过程中，并不伴随Ca<sup>++</sup>的大量累积过程，对Ca<sup>++</sup>的需要也是极为有限的。Fe<sup>+++</sup>浓度在0.10—0.25mg的每升海水中，能够加速无节幼虫的变态。

培养是在无光的条件下进行的，也是导致成功的重要措施之一。因扁藻及无节幼虫都有趋光性，光线不均匀时，很易集中，在集中区易造成代谢产物多、氧含量少的现象，以至影响幼虫的正常生长。而在无光条件下，幼虫和饵料都能均匀分布在整个水体中，这就避免了上述的缺点。

应用上述方法，曾培养过白纹藤壶 (*Balanus amphitrite albicostatum pilsbry*) 和泥藤壶 (*Balanus uliginosus*)，但都未获成功。研究的结果证实，不同种的藤壶幼虫对饵料种类的要求是极不相同的。

## 五、提 要

本文通过纹藤壶幼虫培养条件的试验，解决了培养中的关键性问题，提出了一套能够较大量培养出金星幼虫的培养期短、成活率高、稳定重复的培养方法。

(一) 由于扁藻易被无节幼虫消化吸收，且不易沉底死亡，因此为培养藤壶幼虫的优良饵料。在一立升水体中，幼虫1,000个，投放密度每天每毫升10万个细胞为最适宜。

(二) 水温为25℃时，无节幼虫经六天培

养即可变态为金星幼虫。30℃时，仅四天，说明水温略高对无节幼虫的生长与变态有促进作用。

(三) 在培养过程中，每天换新鲜海水能提高成活率比数。

(四) 在上述条件下，无节幼虫经四天培养即可变态为金星幼虫，成活率达到95%以上。如再添加Fe<sup>+++</sup>，每升的浓度达0.1mg或0.25mg时，促进作用相当显著，培养三天即可使无节幼虫变态为金星幼虫。

## 参 考 文 献

- [1] 吴尚勳、蔡难儿, 1963. 布纹藤壶 *Balanus amphitrite communis* Darwin) 生活史的研究. 海洋科学集刊 4: 103—119.
- [2] 郭季芳等, 1959. 一些可供海产动物体饵料的单胞绿藻及其培养方法初报. 科学通报 11: 368—369.
- [3] 藤永元作、笠原 昊, 1942. タテジマフジツボの飼育と变态. 日本动物学杂志 54 (3): 108—118.
- [4] Barnes, H., Barnes, Margaret, 1959. The naupliar stages of *Balanus nubilis* Darwin. *Canada. J. of zool.* 37: 15—23.
- [5] Bassindal, R., 1936. The developmental stages of three English barnacles, *Balanus balanoides* (L.), *Chthamalus* (Poli) and *Verruca stroemia* (O.F. Muller). *Proc. Zool. Soc. Lond.* 106: 57—74.
- [6] Costlow, John, D. Jr., and C G., bookhout, 1957. Larval development of *Balanus eburneus* in the laboratory. *Biol. Bull.* 112: 313—324.
- [7] Costlow, John, D. Jr., and C G., bookhout, 1958. Larval development of *Balanus amphitrite* var. *denticulata* Broch reared in the laboratory. *Biol. Bull.* 114: 284—295.
- [8] Herz, L.E., 1933. The morphology of the later stages of *Balanus crenatus* Bruguiere. *Biol. Bull.* 64: 432—442.
- [9] Howie, D.I. D., 1958. Dried organic substances as food for larval annelids. *Nature* 181(4621): 1486—1487.
- [10] Moyse, J., 1960. Mass rearing of

barnacle Cyprids in the laboratory. *Nature* 185 (4706): 120.

- [11] Russel, F. S., 1963. *Advances in marine biology*. Volume I, pp.xiii-410. Academic Press, London and New York.

- [12] Walne, P. R., 1963. Observation on the food value of seven species of algae to the larvae of *Ostra edulis*. I. Feeding experiments. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 43 (3):767-784.

### 小知识

## 人工海水和标准海水

当不易得到海水或进行某些特殊研究时，将盐类溶于蒸馏水中制出组成上接近海水的溶液，作为海水的代用品，叫做人工海水。

人工海水的配方有好几种，下表给出了制备氯度为19‰的人工海水的三种配方。

海水氯度的测定是用硝酸银的标准水溶液滴定海水中的卤素 (Cl、Br、I) 实现的。为

此必须对硝酸银的水溶液进行标定。国际委员会规定，对硝酸银水溶液的标定，要用氯度为已知的海水。作为标准的海水的氯度，由权威机构确定并提供给各国使用。这种提供给世界各国海洋观测部门使用的海水，就叫标准海水。

如果采用这种标准海水，并用一定的方法测定氯度，则各国所测定的氯度值，就具有同样的可靠性，能够进行相互比较。

1902年国际常设海洋探讨会议委托哥本哈根的丹麦海洋研究所制作标准海水供各国使用。大约230毫升的标准海水是盛在直径为4.5厘米的细长形的安瓿瓶中。瓶外标明氯度值，精确到小数点以下三位数。 (素青)

人工海水的配方 (Cl=19.00‰)

朱 树 屏		勃鲁叶维奇 (1931) Бруевич		莱曼和弗雷明(1940) Lyman and Fleming	
盐类名称	克/公斤	盐类名称	克/公斤	盐类名称	克/公斤
NaCl	23.477	NaCl	26.518	NaCl	23.476
MgCl <sub>2</sub>	4.981	MgCl <sub>2</sub>	2.447	MgCl <sub>2</sub>	4.981
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.917	MgSO <sub>4</sub>	3.305	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.917
CaCl <sub>2</sub>	1.102	CaCl <sub>2</sub>	1.141	CaCl <sub>2</sub>	1.102
KCl	0.664	KCl	0.725	KCl	0.664
NaHCO <sub>3</sub>	0.192	NaHCO <sub>3</sub>	0.202	NaHCO <sub>3</sub>	0.192
KBr	0.096	NaBr	0.083	KBr	0.096
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.026			H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.026
SrCl <sub>2</sub>	0.024			SrCl <sub>2</sub>	0.024
NaNO <sub>3</sub>	0.050			NaF	0.003
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.005				
NaF	0.003				
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	0.010				
MnCl <sub>2</sub>	0.0002				
FeCsH <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ·3H <sub>2</sub> O	0.00054				
总 计	34.54774	总 计	34.421	合 计	34.481

注：朱树屏的配方含盐种类最多，适于生物实验用。勃鲁叶维奇及莱曼和弗雷明的人工海水是以海水为主要成分为配方的，常用作比色分析时稀释标准液用。