

1235

氨对牡蛎幼虫与幼贝的毒性影响

汪心沅 张德华 季道荣 张劲青

(山东省海水养殖研究所)

我国经济海产动物的增养殖生产,已引起有关方面重视。资源环境保护工作也已提到议事日程,其中水环境化学因子对这些海产动物影响的研究,尽管不少国家的科学工作者,进行了一些工作,但在广度和深度上仍然有限,这对增养殖生产的进一步发展以及完善渔业水质标准来说都是不相适应的。

在工厂化育苗的水环境中和浅水海湾水交换条件较差或靠近生活、工业污水的近岸海水与底泥中,由于饲料、污水中生源有机物的分解和水生动物自身的代谢,容易出现氨的聚集。水环境中的氨达到一定浓度,可直接影响到水生动物的多种生理机能,以至死亡^[1],是水产动物育苗和密集养殖的限制因素之一。

氨对双壳类动物,特别是幼虫、幼贝的影响,还研究得不多。本文报导了使用摄食和新壳生长两种亚致死效应定量方法进行的氨对牡蛎幼虫、幼贝毒性影响的试验研究,并探讨了相应的安全容许限。

一、材料

牡蛎(*Crassostrea gigas* T)的幼虫及幼贝,均取自胶州湾西南薛家岛本所胶南县养殖场试验点。幼虫为壳顶中期,平均壳长为 130 ± 34 微米;幼贝为附着后40天左右,三次取样的平均壳长分别为 15.7 ± 1.1 , 18.2 ± 0.8 和 18.3 ± 0.6 毫米。

二、方法

试验前,取正常的、近生活污水与近工业污水的海水试养牡蛎幼贝。本试验系将牡蛎幼虫和幼贝放入系列氨液的海水中,从各组摄食及新壳生成的数量求得相当对照组的百分数,用Litchfield, J. T. 等^[2]对数概率图法配线,分别查得影响50%及2%的浓度值、即 EC_{50} 及 EC_{2} 值,以后者作为氨的安全容许限。

未离解氨的计算,按Whitfield^[3]的研究,先求得各氨试液中不同离子强度、温度下的 $P.K^a$ 值,进而计算出不同pH条件下,未离解氨与总氨的比值得出未离解氨。

氨对摄食影响的试验,是在系列氨液中定量投入,经24小时饥饿的试验动物和离心浓缩的单胞藻饵料,观察饵料的被摄食量^[6]。试验在避光下进行,使藻体自身消长降到最低限度。为观察试验期间藻体本底的变化,曾作了在同样条件下的系列氨液中,藻体消长的空白

1985年7月22日收到。

本试验承本所谢振汉、温华敏同志协助,并提供宝贵意见,任守燕同志参加水质分析及部分试验工作,在此一并致谢。

试验,表明10小时内吸光值没有变化;第2个10小时有三分之一仍无变化,三分之二减少1.8%;20—34小时各组又减少0.9—1.9%。这种微小变化,看不出与氨液浓度的关系,也许是藻体在避光条件下的自身衰减。而我们所做的摄食试验,多在20小时前完成,所以这个误差可忽略不计。

所用饵料为牟氏角毛藻(*Chaetoceros muelleri* L.)。由于其微粒小,壳面只有几个微米,形状大小基本一致,向试液中投入的饵料浓度适当,其分散程度,可以在充分的时间内保持均匀和稳定,使得有可能试用比浊的原理测定其吸光值(A)。仪器是使用751—G分光光度计,波长420nm。取样用带筛绢的虹吸管,将试验动物幼虫与所用角毛藻分开,分别测定开始与结束时角毛藻液的吸光值 A_1 和 A_2 。 $A_1 - A_2$ 即为相当藻液浓度减少量的净吸光值。该 $A_1 - A_2$ 值,因系同一比色杯测定的结果,所以还消除了因比色杯和海水的吸光值等可能产生的误差。因同批试验使用同批藻种,不涉及不同培养条件下藻液颜色、深度等的差异,所以在各组试液体积相同时,可以直接以各组的 $A_1 - A_2$ 值与对照组的 $A_1 - A_2$ 值相比,求得相当对照组的百分数。这样,可以省去制定各批藻液的浓度—吸光值标准斜率和换算成饵料消耗量的手续。但为了检验目的,我们曾在所配制的饵料试液浓度范围内(每毫升3—20万),布点测定吸光值,均呈线性关系,并在三周内多次配制的藻液,其标准斜率差别不大,吸光值与浓度比(A/C)在200—217之间。

氮对新壳生长影响的试验,使用的牡蛎幼贝,选取体形较圆、壳生长面较均称的幼龄牡蛎。试验开始,先将透明的新生壳抹掉,左壳向下放于盛有系列氨液的各试验缸中,经适当生长时间(96小时),测量其放射状新生壳的最长部位^[7]。

幼虫用摄食法进行,分5个氨浓度组,每组平行3份。因幼虫在摇匀后投入,有很快下沉趋势,幼虫密度依次有所增高,故在试验24小时结束时,检查了投入数及存活数,将摄食率校正到同一存活的密度(每毫升217个),每试验杯保持600毫升水体。试验水温是利用自然海水温度的稳定性,将试验杯放入通有流动海水的长槽中,使试液水温始终保持在 $24.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$,盐度为31.84‰。

幼贝用摄食与新壳生成两种方法进行。分六个氨浓度组,用圆形培养缸,每缸在10升试液中,放幼贝20个,摄食率三次试验进行的时间,分别为8, 10, 12小时,水温分别为25.5、25.1、25.0 $^\circ\text{C}$,新壳生成率试验进行三次,每次为96小时,水温分别为 25.6 ± 0.4 , 25.3 ± 0.3 , 和 $24.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$,海水的盐度范围在32.18—32.88‰之间。

海水采自青岛前海青岛礁东侧岸边。用紫外灯照射,经筛绢与脱脂棉过滤,贮于聚乙烯桶中备用。各试验缸均用S81—1.2小型无油充气机,经气泡石持续充气,使试液中的溶氧,始终保持在饱和状态。随气泡的翻动,又促进饵料以及幼虫的均匀分布。因生物代谢及气液平衡等原因,引起pH值有所变化。而未离解氨这一主要对生物有毒性的组分,在总氨中的比值又强烈取决于pH值,所以为使标准偏差,一般保持在 ± 0.05 个pH以下,除将使用的氯化铵母液,加入适量氢氧化钠溶液调到正常海水的pH值外,并每天调测各组试液的pH两次。pH值因参加未离解氨的计算,其蒸馏水缓冲液标准的盐误差不可忽略,按Hansson^[4]的玻璃电极与甘汞电极组的参数作了校正,在本试验的盐度范围内,约偏高0.15个pH值。总氨—氮的测定采用电位法^[5]。

三、结 果

系列氨液对牡蛎幼虫摄食、幼贝摄食与新壳生长的影响试验,都显示了未离解氨与毒性之间的定量关系,试验结果如表所示。

系列氨液对牡蛎(*C. gigas*)幼虫, 幼贝的影响

单位: mg/l

期 别	试验方法	试验范围	EC ₅₀ 及95%可信限	EC ₂	LC ₅₀ 及95%可信限
幼 虫 (壳顶中期)	摄 食 法 (共分五组, 平行三份,按 平均值计算)	1.NH ₃ -N*	1.NH ₃ -N	1.NH ₃ -N	40-hr LC ₅₀ :
		0.002~0.494	0.170(0.165~0.175)	0.048	1.NH ₃ -N
		2.TNH ₃ -N*	2.TNH ₃ -N	2.TNH ₃ -N	0.80(0.46~0.79)
		0.036~8.787	3.02(2.94~3.11)	0.85	2.TNH ₃ -N
					10.67(8.18~14.05)
幼 贝 (幼体附着后 40天左右)	摄 食 法 (共分六组)	1.NH ₃ -N	1.NH ₃ -N	1.NH ₃ -N	96-hr LC ₅₀ :
		0.002~0.542	0.210(0.155~0.254)	0.045	1.NH ₃ -N
		2.TNH ₃ -N	0.215(0.163~0.284)	0.056	1.00(0.84~1.19)
		0.036~14.978	0.290(0.220~0.382)	0.059	2.TNH ₃ -N
			$\bar{x} = 0.238(0.179 \sim 0.317)$	$\bar{x} = 0.053 \pm 0.007$	17.79(14.92~
	新壳生长法 (共分六组)	1.NH ₃ -N	1.NH ₃ -N	1.NH ₃ -N	21.20)
		0.003~1.265	0.380(0.258~0.559)	0.055	
		2.TNH ₃ -N	0.380(0.282~0.512)	0.061	
		0.053~22.502	0.345(0.262~0.454)	0.064	
			$\bar{x} = 0.368(0.287 \sim 0.508)$	$\bar{x} = 0.060 \pm 0.004$	
		2.TNH ₃ -N	2.TNH ₃ -N	2.TNH ₃ -N	
			$\bar{x} = 6.55(4.75 \sim 9.04)$	$\bar{x} = 1.07 \pm 0.07$	

* 表中NH₃-N代表未离解氨—氮, TNH₃-N代表同一条件下(pH8.1, 25℃, Cl‰17.5)的总氨—氮, 下同。

该试验在亚致死效应方面, 其EC₅₀值表现在同一试验方法中, 幼虫小于幼贝。在同一幼贝试验材料中, 摄食法略低于新壳生长法。在致死效应方面, 其LC₅₀值同样幼虫低于幼贝。因幼虫40小时的LC₅₀值, 已经低于幼贝96小时的LC₅₀值。可以推定, 如果同为96小时LC₅₀值, 幼虫将会比幼贝更低。

四、讨 论

(一) 牡蛎壳顶中期幼虫的EC₂值, 按总氨—氮为0.85毫克/升(pH8.1, 25℃, Cl‰17.5)。在牡蛎育苗中, 一般认为, 壳顶中期的死亡率较高。但据马及地隆幸^[12]报导, 作为缓慢生长的D型幼虫与快速生长的壳顶期交界, 向小型壳顶期变态时, 死亡率较高。所以, 壳顶中期对氨的耐受力, 是否是该牡蛎幼虫各期最低的, 尚待进一步探讨。按本试验幼虫(壳顶中期)及幼贝(附着后40天左右)的安全耐受限, 应分别低于0.8和0.9毫克TNH₃-N/升(pH≤8.1, 25℃, Cl‰17.5)。

(二) 本试验按未离解氨—氮对牡蛎幼贝的致死效应(96小时LC₅₀值为1.00毫克/升)。在

已见报导的鱼类(0.4~3.1毫克/升)、甲壳类(0.4~2.31毫克/升)的范围之内^[11],但远低于Epifanio等^[6]所报导的美洲牡蛎(*Crassostrea Virginica*)、硬壳蛤(*Mercenaria mercenaria*)的幼贝。本试验牡蛎幼贝的亚致死效应(EC_{50} 0.24~0.37毫克/升),按同一摄食法所得结果比较,高于上文所报导的美洲牡蛎(0.14毫克/升),而与硬壳蛤(0.28毫克/升)相近。虽低于已报导的对虾仔虾(*P.orientalis*, 0.516毫克/升)和斑点叉尾鲷的幼鱼(*Ictalurus punctatus*, 0.57毫克/升),并与日本对虾的幼虾(*P.japonicus*, 0.37毫克/升)相近。但后三者所用方法,均按慢性生长试验的湿重得出,所以难以与摄食法的结果作出精确的比较。

(三)在应用新壳生长与摄食方法的同一幼贝材料试验中,初步看出幼贝新壳生成较快,对水环境变化也较敏感,但它与摄食法相比,其缺点是用时较长,前者需要96小时才能看出明显结果,后者用10多小时(幼虫约需20—40小时)即可测出毒性的影响。新壳生长法的优点比较简便易行,三次试验均取得较为平行的结果。摄食法结合三次生长试验进行了六次试验。经检验,其中有三次所配直线的 X^2 值不符合要求,而这三次都是在生长试验的48小时开始的,即摄食试验开始前,已进行生长试验,没有停止投饵。而摄食与新壳生长试验同时开始的试验幼贝,试验前皆停食一天,这样可能使它们处于同样的饥饿状态而取得较好的结果。

另外,新壳生长法所得 EC_{50} 值,较摄食法略高,其95%可信限的区间也略大。这可能与配线的斜率较低有关。同一方法,试验生物浸入试液时间长短也有一些差异,如试验生物已浸入试液90小时开始的摄食试验,其配线斜率较浸入0小时开始者,偏高约6—12%。而使 EC_{50} 浓度值变小,这可能与浸泡时间长、生物活力减弱有关。虽然EC值是影响速率的相对比较,一般产生的偏差不大,但也说明EC值在一定程度上与时间有关。

五、结 语

(一)亚致死效应:

本试验未离解氨—氮对牡蛎幼虫(壳顶中期),幼贝(附着后40天左右) EC_{50} 值的范围为0.17~0.37毫克/升,相当总氨—氮3.02~6.55毫克/升(pH8.1, 25℃, Cl‰17.5)。氨对幼虫的亚致死浓度小于幼贝,处于上述 EC_{50} 值范围的低限。

(二)致死效应:

未离解氨—氮对牡蛎幼虫(壳顶中期)40小时的 LC_{50} 值为0.60(0.46~0.79)毫克/升,相当总氨—氮10.67(8.18~14.05)毫克/升(pH8.1, 25℃, Cl‰17.5)。对幼贝(附着后40天左右)的96小时 LC_{50} 值为1.00(0.84~1.19)毫克/升,相当总氨—氮17.79(14.92~21.20)毫克/升(pH8.1, 25℃, Cl‰17.5)。该 LC_{50} 值,因幼虫40小时已经低于幼贝96小时,故同为96小时氨对幼虫的致死浓度将会比幼贝更低。

(三)按 EC_2 值,本试验幼虫及幼贝的安全耐受限,应分别低于总氨—氮0.8和0.9毫克/升(pH≤8.1, 25℃, Cl‰17.5)。该牡蛎壳顶中期的耐受力是否是幼虫各期最低的,尚待进一步探讨。

(四)本试验未离解氨—氮对牡蛎幼贝的致死效应(96小时 LC_{50} 值)在已报导的鱼类、甲壳类的范围之内,远低于已报导的美洲牡蛎和硬壳蛤的幼贝,但亚致死效应高于美洲牡蛎,而与硬壳蛤相近。

(七)本文将新壳生长法用于氨对牡蛎幼贝的毒性检验, 还就摄食与新壳生长两种方法作了初步比较。

参 考 文 献

- [1] 汪心沅、张淑华、梁作平, 1983海洋湖沼通报 3 : 58—64
- [2] Litchfield, J. T., Wilcoxon, F., 1949 J. Pharmacol. Exp. Ther. 96:99—113
- [3] Whitfield, M., 1974 J. Mar. Biol. Assoc. U. K., 54(3):565—580
- [4] Hansson, I., 1973 Deep-Sea Research, 20:479—491
- [5] 高凤鸣, 1983海水养殖(所刊) 1 : 47—53
- [6] Epifanio, C. E., Srna, R. F., 1975 Marine Biology, 33,241—246
- [7] Butler, P. A., Lowe, J. I., 1978 Bioassay Procedures for the Ocean disposal Permit Program PB-278631,25—27
- [8] 马渡健二, 平山和次, 1975长崎大学水产学部研究报告, 第39号, 1—6
- [9] Wickins, J. F., 1976 Aquaculture, 9:19—37
- [10] Colt, J., Tchobanoglous, G., 1978 Aquaculture, 15:353—372
- [11] Colt, J. E., Armstrong, D. A. 1981 Bio-Engineering symposium for Fish Culture 34—47
- [12] 马及地隆幸, 1980 Ocean Age, 8,65—69

THE TOXIC EFFECT OF AMMONIA ON LARVAE AND JUVENILES OF OYSTER (CRASSOSTREA GIGAS T.)

Wang Xinyuan, Zhang Dehua, Ji Daorong Zhang Shaoqing
(Shandong Marine Cultivation Institute)

Abstract

1. Sublethal effect: In this experiment, the EC_{50} value of un-ionized ammonia (NH_3-N) ranged from 0.17 to 0.37 mg/l, i. e. total ammonia-N 3.02 to 6.55 mg/l (pH 8.1, 25°C, $Cl_{\%}$ 17.5) for oyster larvae (mid umbo stage) and juveniles (about 40 days after setting). The sublethal concentration of ammonia for larvae was less than juveniles and was located at the lower limit of the former EC_{50} value range.

2. Lethal effect: The 40-hr LC_{50} value of un-ionized ammonia (NH_3-N) was 0.60 (0.46-0.79) mg/l, i. e. total ammonia-N 10.67 (8.18-14.05) mg/l (pH 8.1, 25°C, $Cl_{\%}$ 17.5) for oyster larvae and 96-hr LC_{50} value of un-ionized ammonia (NH_3-N) was 1.00 (0.84-1.19) mg/l for juveniles, i. e. total ammonia-N 17.79 (14.92-21.20) mg/l (pH 8.1, 25°C, $Cl_{\%}$ 17.5). So that the lethal concentration of ammonia for larvae at the same time was less than that for juveniles.

转47页