

亚硝酸盐和硫化物对克氏原螯虾幼虾的毒性效应研究

於叶兵¹, 陆伟², 黄金田¹, 赵卫红¹, 吕林兰¹, 王爱民¹

(1. 盐城工学院海洋技术系, 江苏 盐城 224051; 2. 江苏盱眙满江红龙虾产业园有限公司, 江苏 盱眙 211700)

摘要: 采用静水法生物测试, 研究了亚硝酸盐(NO_2^- -N)和硫化物(S^{2-})对克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)幼虾急性毒性效应。实验结果表明, 克氏原螯虾幼虾的死亡率随着 NO_2^- -N和 S^{2-} 浓度的升高和暴露时间的延长而显著上升。 NO_2^- -N对克氏原螯虾幼虾 24、48、72、96 h 的半致死浓度(LC₅₀)分别为 108.09、90.08、73.02、69.74 mg/L。 S^{2-} 对克氏原螯虾幼虾 24、48、72、96 h 的半致死浓度(LC₅₀)分别为 12.96、9.57、7.62、4.63 mg/L。克氏原螯虾幼虾对 NO_2^- -N和 S^{2-} 的安全浓度(SC)分别为 6.97 mg/L 和 0.46 mg/L, 为相应渔业水质标准的 35 倍和 2.3 倍, 说明克氏原螯虾对 NO_2^- -N和 S^{2-} 的毒性具有一定的耐受力, 且对 NO_2^- -N的耐受能力强于 S^{2-} 。

关键词: 克氏原螯虾; 亚硝酸盐; 硫化物; 半致死浓度; 安全浓度

中图分类号: X503.225 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-3075(2011)01-0111-04

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)俗称小龙虾或淡水龙虾, 隶属于甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、螯虾科(Cambaridae), 是常见的淡水经济虾类。目前, 有关克氏原螯虾的研究主要集中在幼体形态发育、营养生理和基础代谢等方面(郭晓鸣等, 1997; 温小波等, 2003; 张世萍等, 2003; 吕佳等, 2004), 水体污染对其毒性效应的研究较少(朱玉芳等, 2001)。而在养殖生产中, 水体受到污染往往引起水产动物的生理异常甚至死亡, 其产生的毒性作用直接影响动物的存活、生长和发育。国内已有的报道研究了水体中关键理化因子(如亚硝酸盐、硫化物、氨氮)对一些水产动物(如鳊、日本对虾、河蟹)的毒性效应影响(石俊艳等, 1999; 王仁杰等, 2007; 陈瑞明, 1998), 但仍缺乏对克氏原螯虾的深入研究。本文拟采用静水法生物测试, 研究亚硝酸盐和硫化物对克氏原螯虾幼虾急性毒性效应, 确定其安全浓度, 为克氏原螯虾的生态育苗和健康养殖提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料及条件

实验所用的克氏原螯虾幼虾来自于江苏盐城农佳龙虾养殖专业合作社, 选择附肢齐全、健康活泼、

规格一致的个体作为实验的幼虾。体长 1.1 ~ 1.5 cm, 体重 0.0142 ~ 0.0308 g。幼虾实验前在室内水族箱暂养 1 周, 正式实验前 24 h 停止喂食。

实验所用的水为充分曝气的自来水, pH 为 7.8, 水温通过水浴锅控制在(20 ± 1)℃, 溶解氧 5.25 ~ 7.35 mg/L; NO_2^- -N 和 H_2S 均未检出, NO_2^- -N 浓度的测定采用重氮-偶氮比色法, 硫化氢浓度的测定采用 N,N-对氨基二乙基苯胺比色法(陈佳荣, 1996)。

将分析纯的亚硝酸钠和硫化钠烘干后, 放在干燥器内冷却, 用蒸馏水配制成母液, 实验时按比例稀释至所需浓度。

1.2 实验方法

根据预实验结果, 按等对数间距设置 5 个浓度实验组, 同时设置 1 个对照组, 具体浓度见表 1。每组 2 个平行, 每个平行 10 尾幼虾, 实验容器为容量 1 000 mL 的烧杯。实验期间为了保证每个烧杯中试剂的浓度稳定, 每 12 h 完全换 1 次溶液, 每日测定 3 次水温。实验期间不投喂饵料。

表 1 2 种化合物的实验浓度

Tab. 1 The experimental concentration of two compounds mg/L

编号	对照	I	II	III	IV	V
亚硝酸盐	未检出	60.00	71.37	84.86	100.90	120.00
硫化物	未检出	6.08	8.00	10.53	13.85	18.23

实验开始后 8 h 做连续的观察, 8 h 后进行定期观察, 并记录实验幼虾在 24、48、72、96 h 的活动及死亡情况, 并及时捞出死亡的个体。克氏原螯虾幼虾的死亡判断以细玻璃棒触及其腹部 5 min 内不产

收稿日期: 2010-06-25

基金项目: 2008 年第七批省级科技创新与成果转化(苏北科技富民强县)专项引导资金项目(编号: BN2008233)。

通讯作者: 王爱民。E-mail: bluesewam@ycit.cn

作者简介: 於叶兵, 1980 年生, 男, 讲师, 研究方向为水产经济动物增养殖。E-mail: yuyebing2005@126.com

生反应为死亡标准。实验观察的记录内容包括幼虾的异常行为、体色的变化、死亡症状、个体死亡数量。

1.3 数据处理

采用概率法计算克氏原螯虾幼虾 24、48、72、96 h 的半致死浓度 LC_{50} (周永欣, 1989), 安全浓度 SC (Sprague, 1971) 的计算公式如下:

$$SC = 0.1 \times 96 \text{ h } LC_{50}。$$

采用 Spss 18.0 对死亡率数据进行单因子方差分析 (One-Way ANOVY), 用 Duncan 氏多重比较分析组间差异显著性程度, 显著水平为 ($P < 0.05$)。死亡率数据用平均值 \pm 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 亚硝酸盐对克氏原螯虾幼虾的急性毒性效应

亚硝酸盐对克氏原螯虾幼虾的急性毒性效应见表 2。由表 2 可见, NO_2^- -N 浓度越高和接触时间延长, 幼虾死亡率显著升高。随着实验时间的延长, V 组和 IV 组的幼虾存活率迅速降低, 分别于实验 48、72 h 时死亡率达到 100%。

对表 2 的数据作直线回归处理, 并计算出 NO_2^- -N 对克氏原螯虾幼虾 24、48、72、96 h 的半致死浓度和安全浓度, 结果如表 3 所示。克氏原螯虾幼虾的死亡率与 NO_2^- -N 的浓度成正相关 ($P < 0.01$); NO_2^- -N 对克氏原螯虾幼虾的安全浓度为 6.97 mg/L。

表 2 NO_2^- -N 对克氏原螯虾幼虾的急性毒性实验结果

Tab. 2 The acute toxic effects of NO_2^- -N on *Procambarus clarkii* juvenile

组别	NO_2^- -N 浓度/ mg · L ⁻¹	浓度 对数	不同实验时间的死亡率/%			
			24 h	48 h	72 h	96 h
V	120.00	2.0791	65.00 \pm 7.07 ^a	100.00 \pm 0.00 ^a	100.00 \pm 0.00 ^a	100.00 \pm 0.00 ^a
IV	100.90	2.0039	35.00 \pm 7.07 ^b	60.00 \pm 0.00 ^b	100.00 \pm 0.00 ^a	100.00 \pm 0.00 ^a
III	84.86	1.9287	25.00 \pm 7.07 ^{bc}	45.00 \pm 7.07 ^c	75.00 \pm 7.07 ^b	80.00 \pm 0.00 ^b
II	71.37	1.8535	20.00 \pm 0.00 ^{bc}	30.00 \pm 0.00 ^d	45.00 \pm 7.07 ^c	55.00 \pm 7.07 ^c
I	60.00	1.7781	5.00 \pm 7.07 ^d	15.00 \pm 7.07 ^e	20.00 \pm 0.00 ^d	30.00 \pm 0.00 ^d
对照	未检出	0.0000	0.00 \pm 0.00 ^d	0.00 \pm 0.00 ^f	0.00 \pm 0.00 ^e	0.00 \pm 0.00 ^e

注: 同一列数据右上角不同上标小写字母代表有显著差异 ($P < 0.05$)。

Note: Means with different superscripts within the same column are significantly different ($P < 0.05$).

表 3 亚硝酸盐对克氏原螯虾幼虾的半致死浓度 (LC_{50}) 和安全浓度 (SC)

Tab. 3 The LC_{50} and SC of nitrite to *Procambarus clarkii* juvenile

时间/ h	$y = ax + b$	r	P	LC_{50} / mg · L ⁻¹	95% 置信限/ mg · L ⁻¹	SC/ mg · L ⁻¹
24	$y = -7.1914 + 5.9943x$	0.9696	< 0.01	108.09	92.15 ~ 126.79	6.97
48	$y = -6.0674 + 5.6621x$	0.9970	< 0.01	90.08	83.40 ~ 97.31	
72	$y = -13.6893 + 10.0295x$	0.9994	< 0.01	73.02	59.52 ~ 89.58	
96	$y = -13.4902 + 10.0300x$	0.9994	< 0.01	69.74	56.91 ~ 82.90	

注: y 表示死亡概率单位, x 表示浓度对数。

Note: y means the death probability unit, x means the concentration logarithm.

2.2 硫化物对克氏原螯虾幼虾的急性毒性效应

硫化物对克氏原螯虾幼虾的急性毒性效应见表 4。由表 4 可见, S^{2-} 对幼虾的毒性作用规律与 NO_2^- -N 对幼虾的毒性类似。24 h 时, I、II 组实验的幼虾均未死亡, 而 V 组的死亡率为 85%, 48 h 时, V 组死亡率为 100%, 72 h 时, IV 组死亡率为 100%。

对表 4 的数据作直线回归处理, 并计算出 S^{2-} 对克氏原螯虾幼虾 24、48、72、96 h 的半致死浓度和安全浓度, 结果见表 5。克氏原螯虾幼虾的死亡率与 S^{2-} 的浓度成正相关的正相关 ($P < 0.01$); S^{2-} 对克氏原螯虾幼虾的安全浓度为 0.46 mg/L。

2.3 克氏原螯虾幼虾的中毒症状

实验期间, 各实验组包括对照组幼虾均有蜕壳现象发生, 但对对照组没有虾死亡。幼虾在 2 种化学物质的实验组的中毒症状相似, 只是时间长短不一, 均为开始时急躁不安, 沿杯壁胡乱游动, 一段时间后行动减缓, 不时侧游、侧翻, 游泳足摆动缓慢, 若受惊, 能迅速逃游, 但片刻后又侧游、侧翻; 稍后幼虾身体弯曲, 体色变淡, 活动微弱, 若受惊, 已经不能逃游, 呈现昏迷状态, 沉入水底不动。随着时间的延长, 幼虾的反应越来越迟钝, 头胸部附肢或仅有腹部附肢运动缓慢, 身体蜷缩, 最终附肢停止运动。在此过程中, 幼虾的体色也发生了明显的变化, 由开始的健康的淡红色变成暗灰色, 继而变成灰白色, 死亡个体的头胸部与腹部有明显的分节。

表4 S²⁻对克氏原螯虾幼虾的急性毒性实验结果Tab.4 The acute toxic effects of S²⁻ on *Procambarus clarkii* juvenile

组别	S ²⁻ 浓度/ mg · L ⁻¹	浓度 对数	不同实验时间的死亡率/%			
			24 h	48 h	72 h	96 h
V	18.23	1.2609	85.00 ± 7.07 ^a	100.00 ± 0.00 ^a	100.00 ± 0.00 ^a	100.00 ± 0.00 ^a
IV	13.85	1.1416	45.00 ± 7.07 ^b	80.00 ± 0.00 ^b	100.00 ± 0.00 ^a	100.00 ± 0.00 ^a
III	10.53	1.0223	35.00 ± 7.07 ^b	65.00 ± 7.07 ^c	75.00 ± 7.07 ^b	80.00 ± 0.00 ^b
II	8.00	0.9030	0.00 ± 0.00 ^c	35.00 ± 7.07 ^d	50.00 ± 0.00 ^c	75.00 ± 7.07 ^b
I	6.08	0.7837	0.00 ± 0.00 ^c	10.00 ± 0.00 ^e	35.00 ± 7.07 ^d	60.00 ± 0.00 ^c
对照	未检出	0.0000	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^f	0.00 ± 0.00 ^e	0.00 ± 0.00 ^d

注:同一列数据右上角不同上标小写字母代表有显著差异($P < 0.05$)。

Note: Means with different superscripts within the same column are significantly different ($P < 0.05$).

表5 硫化物对克氏原螯虾幼虾的半致死浓度(LC₅₀)和安全浓度(SC)Tab.5 The LC₅₀ and SC of sulfide to *Procambarus clarkii* juvenile

时间/ h	$y = ax + b$	r	P	LC ₅₀ / mg · L ⁻¹	95% 置信限/ mg · L ⁻¹	SC/ mg · L ⁻¹
24	$y = -1.6772 + 6.0011x$	0.9389	< 0.01	12.96	10.10 ~ 16.53	0.46
48	$y = -0.8770 + 5.9904x$	0.9902	< 0.01	9.57	7.86 ~ 11.66	
72	$y = -1.0796 + 4.4442x$	0.9886	< 0.01	7.62	6.04 ~ 9.57	
96	$y = -3.3529 + 2.4733x$	0.9713	< 0.01	4.63	3.47 ~ 6.15	

注: y 表示死亡概率单位, x 表示浓度对数。

Note: y means the death probability unit, x means the concentration logarithm.

3 讨论

3.1 不同虾类对NO₂⁻-N毒性的耐受性

NO₂⁻-N的毒性作用是由于NO₂⁻-N进入血液后,将血红蛋白分子的Fe²⁺氧化成为Fe³⁺,抑制血液的载氧能力,从而造成组织缺氧、神经麻痹甚至窒息死亡(Alderson 1979; Person et al, 1995; 王明学, 1995)。NO₂⁻-N对0.99 cm、P6、5 cm的南美白对虾幼虾的96 h LC₅₀分别为19.1、25.7、55.51 mg/L(姚庆祯等, 2002; 孙国铭等, 2002; 彭自然等, 2004)。可见,南美白对虾对NO₂⁻-N的耐受力随个体发育而逐渐增强。NO₂⁻-N对日本对虾幼体(P3)、罗氏沼虾幼体(Z9)和长毛对虾仔虾(P5)的96 h LC₅₀分别为20.6、9.7 mg/L和13.8 mg/L(姚庆祯等, 2002; 刘淑梅等, 1999; 高淑英和邹栋梁, 1994)。本实验中,NO₂⁻-N对克氏原螯虾幼虾的96 h LC₅₀为69.74 mg/L,远高于上述几种虾类。相差较大,可能与实验用虾的个体发育情况有关,具体原因还有待于进一步研究。

3.2 不同虾类对硫化物毒性的耐受性

水体中的硫化物主要以硫化氢(H₂S)、硫氢根(HS¹⁻)和硫离子(S²⁻)3种形态存在,其中硫化氢和硫氢根能够作用于蛋白质结构中的巯基基团,形成共价结合键,抑制蛋白质的作用,从而表现出毒性作用。日本对虾幼体随着硫化氢的浓度的升高和中

毒时间的延长,死亡率明显升高(李建等, 2007),这与本实验结果一致。S²⁻对日本对虾蚤状幼体、糠虾幼体和仔虾的96 h LC₅₀分别为0.430、0.553和0.705 mg/L(李建等, 2007); S²⁻对河蟹Z3、Z5、M幼体的96 h LC₅₀分别为2.75、2.95、3.61 mg/L(石俊艳等, 1999)。说明随着个体的发育,虾蟹类幼体对硫化物的耐受力逐渐增强,且不同甲壳动物对S²⁻毒性耐受性不同。而本实验S²⁻对克氏原螯虾幼虾的96 h LC₅₀为4.63 mg/L,比日本对虾和河蟹的高,说明克氏原螯虾幼虾对硫化物毒性的耐受性比日本对虾和河蟹都强。

《渔业水质标准》规定,养殖水体中亚硝酸盐和硫化物的浓度都应不高于0.2 mg/L,而NO₂⁻-N和S²⁻对克氏原螯虾幼虾的安全浓度分别为6.97 mg/L和0.46 mg/L,分别是水质标准的35倍和2.3倍,说明克氏原螯虾对NO₂⁻-N和S²⁻的毒性具有一定的耐受能力,且对NO₂⁻-N的耐受力强于S²⁻。而对于不同的试验生物,NO₂⁻-N和S²⁻的毒性不仅因种类有所差异,而且还与不同环境条件下动物个体大小、发育水平及生理状态有关,其影响机理有待于进一步研究。

参考文献

- 陈佳荣. 1996. 水化学实验指导书[M]. 北京: 中国农业出版社: 126-128, 173-175.
陈瑞明. 1998. 铵态氮和亚硝酸盐氮对鳃鱼苗的急性毒性试

- 验[J]. 水利渔业, (1): 17-20.
- 高淑英, 邹栋梁. 1994. 亚硝酸盐对长毛对虾幼体的毒性[J]. 台湾海峡, 13(3): 236-239.
- 郭晓鸣, 朱权松. 1997. 克氏原螯虾幼体发育的初步研究[J]. 动物学报, (4): 372-381.
- 国家环保局编委会. 1993. 水生生物监测手册[M]. 南京: 东南大学出版社: 44-51, 106-111.
- 李建, 姜令绪, 王文琪, 等. 2007. 氨氮和硫化氢对日本对虾幼体的毒性影响[J]. 上海水产大学学报, 16(1): 1-6.
- 刘淑梅, 孙振中, 戚隽渊, 等. 1999. 亚硝酸盐氮对罗氏沼虾幼体的毒性实验[J]. 水产科技情报, 26(3): 281-284.
- 吕佳, 宋胜磊, 唐建清, 等. 2004. 克氏原螯虾受精卵发育的温度因子数学模型分析[J]. 南京大学学报: 自然科学版, (2): 130-132.
- 彭自然, 臧维玲, 高杨, 等. 2004. 氨和亚硝酸盐对凡纳滨对虾幼体的毒性影响[J]. 上海水产大学学报, 13(3): 274-278.
- 石俊艳, 刘中, 丁茂昌, 等. 1999. 亚硝酸盐、硫化物与氨对河蟹幼体的急性毒性实验[J]. 辽宁大学学报: 自然科学版, 26(1): 91-96.
- 孙国铭, 汤建华, 仲霞铭. 2002. 氨氮和亚硝酸盐氮对南美白对虾的毒性研究[J]. 水产养殖, (1): 23-25.
- 王明学. 1995. Cl^- 在 NO_2^- -N 对鲢毒性试验中的拮抗作用初探[J]. 淡水渔业, 25(6): 3-5.
- 王仁杰, 姜令绪, 李建. 2007. 氨氮和硫化氢对日本对虾幼体生长和变态发育的影响[J]. 海洋科学, 12(7): 51-85.
- 温小波, 库天梅, 罗静波. 2003. 克氏原螯虾耗氧率及窒息点的研究[J]. 大连水产学院学报, (3): 170-174.
- 姚庆祯, 臧维玲, 戴习林, 等. 2002. 亚硝酸盐和氨对凡纳对虾和日本对虾幼体的毒性作用[J]. 上海水产大学学报, 11(1): 22-25.
- 张世萍, 金辉, 俸艳萍, 等. 2003. 河蟹、克氏原螯虾、黄鳝摄食生态的研究[J]. 水生生物学报, 27(5): 496-501.
- 周永欣, 章宗涉. 1989. 水生生物毒性试验方法[M]. 北京: 农业出版社: 114-122.
- 朱玉芳, 崔勇华, 戈志强, 等. 2001. 重金属元素在克氏原螯虾体内的生物富集作用[J]. 水利渔业, 21(1): 11-12.
- Alderson R. 1979. The effect of ammonia on the growth of juvenile dover sole, *Sole sole* (L.) and turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) [J]. Aquaculture, 17: 291-309.
- Person J, Le Ruyet, Chartois H, et al. 1995. Comparative acute ammonia toxicity in marine fish and plasma ammonia response[J]. Aquaculture, 136(1): 181-194.
- Sprague J B. 1971. Measurement of pollutant toxicity to fish. III. Sublethal effects and safe concentrations [J]. Water Res, 5: 245-246.

(责任编辑 万月华)

Study on the Acute Toxicity of NO_2^- -N and S^{2-} Acting on *Procambarus clarkii* Juvenile

YU Ye-bing¹, LU Wei², HUANG Jin-tian¹, ZHAO Wei-hong¹, LV Lin-lan¹, WANG Ai-ming¹

- (1. Department of Ocean Technology, Yancheng Institute of Technology, Yancheng Jiangsu 224051, China;
2. The Limited Company of Azolla Lobster Industry Park in Jiangsu Xuyi, Xuyi Jiangsu 211700, China)

Abstract: The hydrostatic test was used to research the acute toxicity of NO_2^- -N and S^{2-} acting on *Procambarus clarkii* juvenile. Test results show that the death rate of *Procambarus clarkii* juvenile rised evidently as the increase of the contact time with Laboratory reagent and concentration of NO_2^- -N and S^{2-} . The median lethal concentrations (MLC) of NO_2^- -N for *Procambarus clarkii* juvenile of 24 h, 48 h, 72 h and 96h were 108.09 mg/L, 90.08 mg/L, 73.02 mg/L and 69.74 mg/L, and the MLC of S^{2-} for *Procambarus clarkii* juvenile of 24 h, 48 h, 72 h and 96 h were 12.96 mg/L, 9.57 mg/L, 7.62 mg/L and 4.63 mg/L, the safe concentration of NO_2^- -N and S^{2-} for *Procambarus clarkii* juvenile were 6.97 mg/L and 0.46 mg/L respectively, which were 35 times and 2.3 times for the corresponding water standands of the fisheries. *Procambarus clarkii* has a strong resistance to NO_2^- -N and S^{2-} in the capacity of water, and resistance to NO_2^- -N was stronger than S^{2-} .

Key words: *Procambarus clarkii*; NO_2^- -N; S^{2-} ; semi-lethal concentration; safe concentration