

臭氧对西施舌胚胎孵化率和幼虫摄食生长与成活的影响

高如承, 庄惠如, 汪彦情

(福建师范大学 生命科学学院, 福建 福州 350108)

摘要: 研究了臭氧处理后的海水对西施舌 (*Coelomactra antiquata*) 胚胎孵化率、幼虫摄食率、生长率和成活率的影响。结果表明, 臭氧处理后的海水的化学耗氧量 (COD) 及 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的浓度明显下降。西施舌胚胎在通入臭氧 (4.17 mg/L) 10 min 的海水中, 孵化率最高, 为 97%, 在充入臭氧 25 min 的海水中孵化率最低, 为 72.7%; 西施舌幼虫在充入臭氧 10~15 min 的海水和未经处理的海水中生长较快; 幼虫在充入臭氧 5 min 和 10 min 的海水中成活率有所提高。将幼虫放在多次充入臭氧的海水中培养, 再放回未经臭氧处理的海水进行 17 h 和 30 h 恢复, 30 h 后其死亡率达 85%, 而在充入臭氧时间短的海水中死亡率较低, 为 33.3%, 表明西施舌幼虫的生理机能受到了臭氧的不可恢复破坏。

关键词: 臭氧; 西施舌 (*Coelomactra antiquata*); 孵化率; 幼虫; 生长; 成活率

中图分类号: S96 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096 (2007) 09-0039-05

西施舌 (*Coelomactra antiquata*) 是一种高经济价值的双壳类海珍品。国内学者对西施舌的生物学、人工育苗进行了研究, 阐明了西施舌生活史、摄食代谢、染色体核型、保护区和生态条件^[1]。在西施舌人工育苗过程中, 污染的水源对西施舌幼虫构成威胁, 目前采用含氯的消毒剂处理水源, 虽然起到杀菌的作用, 但容易造成二次污染, 危害着西施舌幼虫的成活, 影响着幼虫的健康成长。

应用臭氧技术净化育苗用水, 不但起到杀菌消毒、分解污染物的作用, 而且不产生二次污染, 为高密度育苗创造有利条件。臭氧作为氧化剂、消毒剂、催化剂已广泛地应用在许多行业。臭氧对海水鱼、对虾、牡蛎胚胎的影响^[2~8], 以及鱼虾毒性效应^[9]、育苗用水理化指标^[10,11]等方面的影响国内外已有报道, 但臭氧处理海水对西施舌生理效应影响的研究, 尚未见报道。本研究用臭氧处理后的海水进行西施舌人工受精和幼虫培养, 探讨了西施舌胚胎孵化对臭氧的耐受性, 以及臭氧处理后的海水对西施舌幼虫摄食率、生长率和成活率的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

亲贝取自长乐漳港。挑选性成熟的西施舌, 解剖

后获取成熟的精子和卵子, 将精子、卵子在天然沙滤的海水中混合受精。海水盐度 28, pH8.2, 水温 23 °C; 孵出 D 形面盘幼虫在方形玻璃缸中培养, 作为试验用幼虫, 其平均壳长为 72.82 μm , 壳高 60.64 μm 。

1.2 海水和臭氧处理系统

海水取自漳港自然海区, 经沉淀沙滤后, 再进行臭氧处理。臭氧消毒净化机 OSL777-IV 型, 臭氧充气量为 1 g/h, 质量浓度为 4.17 mg/L。

1.3 水质的测定

化学耗氧量 (COD) 用碱性 KMnO_4 法测定, 检测下限为 0.8 mg/L; 美国产 HACH DR890 型水质分析仪测定氨氮、亚硝酸的含量; REF211 型盐度计测定海水盐度, 美国产 ORION Thermo868 型 pH 计测定海水 pH。

收稿日期: 2007-01-12; 修回日期: 2007-07-13

基金项目: 国家 863 计划资助项目 (2004AA603140), 福建省重大项目 (2003N020), 福建省重点项目 (2006N0038)

作者简介: 高如承 (1958-), 男, 福建福州人, 副教授, 硕士生导师, 从事海洋生物及水产养殖研究, 电话: 0591-85335968, E-mail: rcgao@fjnu.edu.cn

1.4 西施舌胚胎的孵化

人工解剖西施舌亲贝,分别取其精、卵等量在5个装10 L过滤海水的容器中受精,卵的极体出现时,显微镜下统计受精率。将海水分成5组,分别通入臭氧10、15、20、25 min,另设1个不通臭氧的空白对照组。西施舌受精卵分别用相应浓度的臭氧处理后的海水洗卵,然后放在相应的实验组中培养,密度为5个/mL,并每隔1 h观察西施舌胚胎发育的情况,待到12 h左右,胚胎绝大多数进入了D形面盘幼虫时期,在显微镜下统计孵化率和畸形率。实验海水盐度30,水温 25 ± 1 °C。

1.5 幼虫摄食率的实验

实验容器是4 L的方形玻璃缸,注入2 L过滤海水,海水盐度30,水温24 °C。随机取西施舌D形面盘幼虫(平均壳长72.82 μm ,平均壳高60.64 μm)投放玻璃缸中,投放密度5个/mL。实验分4组臭氧浓度梯度,各组充臭氧时间依次为3、5、7、10 min,每日充臭氧3次,每次间隔2 h,设未经臭氧处理的海水为对照组。每天固定时间(上午9:00)测COD、pH、水温;隔日换水1/5,各实验组等量投饵,饵料为球等鞭金藻(*Isochrysis galdana*),饵料投放密度 5×10^4 个/mL。每天固定时间(15:00)显微镜下计数海水中球等鞭金藻的密度,从而计算幼虫摄食率,摄食率 $=C_0 - C_t / C_0$, C_0 为藻类的起始密度, C_t 为藻类的结束密度。

1.6 生长率及成活率实验

实验分为充入臭氧时间5、10、15 min 3个组,设未经臭氧处理的海水为对照组,其它条件同1.5。实验初始使用平均壳长250 μm 幼虫。每天固定时间(15:00)取幼虫20个,镜检其胃含物饱满度,发现幼虫已摄食,即用4%福尔马林固定,测量个体大小;计数幼虫密度,计算成活率。

1.7 幼虫的致死实验

实验条件和幼虫大小同1.5。通过预实验结果,选定24 h分别充入臭氧3次,第1组每次充入臭氧时间10 min,第2组每次充臭氧时间30 min,每次充入臭氧2 h后计数幼虫的死亡率。恢复性实验时,把幼虫置于未充入臭氧的海水中,分别培养17 h和30 h,然后观察和统计幼虫的死亡率。

1.8 数据分析

所有实验均进行3次重复,数据取平均值进行标准差分析。

2 结果

2.1 臭氧处理后海水水质变化

从表1可看出,实验海水经臭氧处理后,COD和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的质量浓度明显降低,而 NO_2^- 的质量浓度则稍微降低;海水的pH从8.00升至8.05,略有提高;盐度保持在30不变,说明臭氧对pH、盐度影响不显著;从水质变化可见,臭氧对育苗海水水质改善明显,尤其对COD和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的质量浓度影响显著。

表1 海水经臭氧处理后水质的变化

Tab.1 Water quality changes of ozone treated seawater

组别	COD (mg/L)	$\text{NH}_4^+\text{-N}$ (mg/L)	NO_2^- (mg/L)	pH	盐度
处理10 min	0.86±0.04	0.11±0.02	0.040±0.003	8.05±0.14	30
对照组	2.04±0.84	0.13±0.03	0.043±0.004	8.00±0.10	30

2.2 臭氧处理后的海水对西施舌孵化率和畸形率的影响

臭氧处理后,西施舌受精卵的孵化率明显提高,由对照组的94.4%提升至充入臭氧10 min的97%,但是充入臭氧15 min后,随着水中臭氧浓度的提高,孵化率却逐渐下降,当通入臭氧25 min时孵化率最低,为72.7%;畸形率的曲线显示,西施舌在充入臭氧10 min时畸形率最低,为3%,在充入臭氧处理

15 min后明显增加,当充入臭氧25 min时,畸形率升至最高,为27.3%,因此,在通入臭氧10 min的海水中,西施舌孵化效果最佳(图1)。

2.3 臭氧对西施舌幼虫摄食率的影响

在通入臭氧3、5、7 min的实验组中,西施舌幼虫的摄食率曲线较规则,随时间的增加均呈上升趋势,而且每天的摄食率都比对照组高;在实验的第2天,通入臭氧的实验组(3、5、7、10 min)幼虫的

摄食率均比对照组高；第3天之后，只有10 min组呈现摄食率低于对照组。实验4天中，摄食率最高的是7 min组（90%），出现在实验的第3、4天，与第3天的对照组（59.1%）比较，相对高出30.9%，表明低浓度臭氧明显促进西施舌幼虫摄食率的增长（图2）。

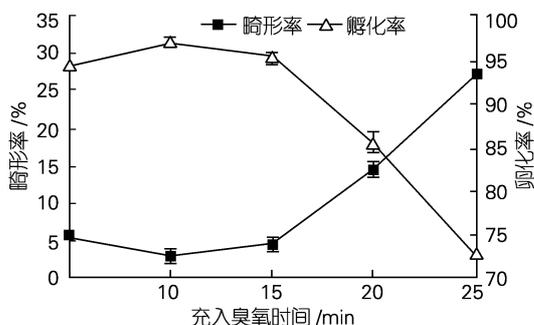


图1 臭氧处理水对西施舌胚胎孵化率和畸形率的影响
Fig.1 Effect of ozone treated seawater on hatch rate and malformation rate of *Coelomactra antiquata* embryos

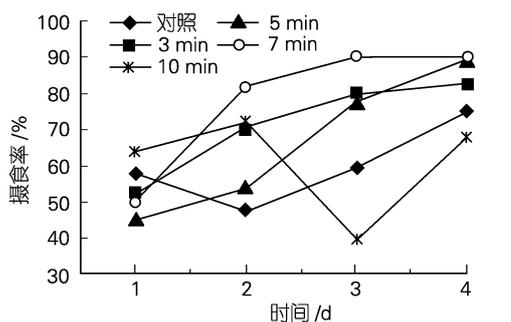


图2 臭氧对西施舌幼虫摄食率的影响
Fig.2 Effect of ozone treatment on the ingestion rate of *Coelomactra antiquata* larvae

2.4 臭氧对西施舌幼虫生长和成活率的影响

图3结果表明，充入臭氧5 min的实验组至第5天，幼虫平均壳长均比任何组生长快；充入臭氧10、15 min组的幼虫，在3 d后生长较快；到第7天未经臭氧处理海水中的幼虫比充入臭氧组生长的快。

西施舌幼虫经7 d的培养，充入臭氧的实验组和对照组的成活率如图4所示。由图4可见，充入臭氧5 min的实验组幼虫的成活率最高。实验第3天，充入臭氧的实验组成活率均比对照组高。5 d后短时间

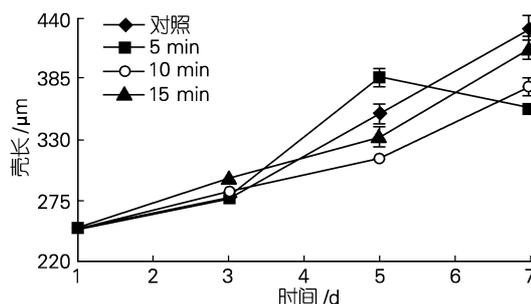


图3 臭氧对西施舌幼虫生长的影响

Fig.3 Effect of ozone on the growth of *Coelomactra antiquata* larvae

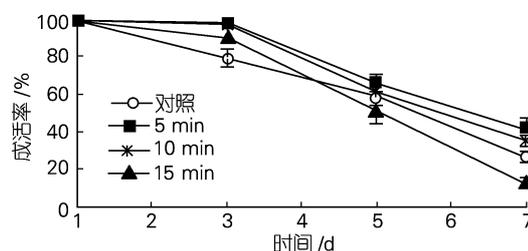


图4 臭氧对西施舌幼虫的成活率的影响

Fig.4 Effect of ozone on the survival of *Coelomactra antiquata* larvae

充入臭氧的5 min和10 min组，幼虫成活率仍比对照组的高，但充入臭氧较多的15 min组的成活率比对照组低。通过比较，5 min和10 min组幼虫成活率都比对照组和充入臭氧后15 min组高。每日充臭氧后1~2 h计数幼虫成活率，显微镜下观察到死亡的幼虫，面盘收缩，停止活动，内脏呈灰白色，幼虫胃中观察不到食物粒，有些甚至呈空壳状态。

从幼虫生长情况和成活率来看，西施舌幼虫适宜的充入臭氧时间是10 min。

2.5 西施舌幼虫在高浓度臭氧下的致死实验

表2结果显示，充入臭氧次数增加，西施舌幼虫的死亡率逐渐升高。在第2组实验结束，把西施舌幼虫放进未经臭氧处理的海水中，恢复17 h后，接触高浓度臭氧的西施舌幼虫死亡率上升至41.3%，30 h之后甚至达到58%，说明高浓度臭氧在海水中具有持续的、较长时间的致死作用。但接触较低浓度臭氧的西施舌幼虫（第1组）死亡率明显比第2组低 ($P<0.05$)。

表 2 臭氧对西施舌幼虫死亡率的影响

Tab.2 Effect of ozone on mortality of *Coelomactra antiquata* larvae

组别	充入臭氧时间 (min)	死亡率 (%)				
		充入臭氧次数			致死恢复时间(h)	
		1	2	3	17	30
1	10	3.0	7.1	9.7	28.3	33.3
2	30	8.0	9.0	13.0	41.3	58.0

3 讨论

3.1 臭氧对西施舌胚胎孵化率影响

海水经臭氧短时间处理,西施舌胚胎孵化率比对照提高 3.4%,随着充入臭氧时间延长,水中臭氧浓度升高,孵化率呈下降趋势。类似的规律日本对虾也有,Coman 报道^[2]:日本对虾孵化率随臭氧浓度增加反而下降,与高浓度臭氧短间接接触结果表明,臭氧对日本对虾的胚胎产生更大的毒性。低浓度的臭氧与西施舌胚胎长时间接触,对其胚胎毒性较小。本研究还表明,低浓度臭氧处理后的海水能促进西施舌胚胎孵化,其机理之一可能是臭氧浓度较低时,降低多精入卵的机会,Maclean^[3]对牡蛎(*Crassostrea virginia*)的研究表明,臭氧对牡蛎卵膜具有优先选择作用,会使多精入卵机会降低,而且阻止了牡蛎受精中发生孤雌生殖。

3.2 臭氧对西施舌幼虫生长和成活率的影响

本实验结果表明,臭氧处理后,育苗水中氨氮和亚硝酸盐得到降解,COD 显著降低。李宝华等^[11]的实验证明,臭氧对有机物有一定的降解作用,臭氧经 D 反应和 R 反应途径与水中有机物起反应,D 反应是有机物与臭氧直接反应,R 反应为有机物与臭氧分解过程中产生的羟基自由基 OH 发生间接反应;在 pH 较低时主要起 D 反应,在 pH 较高时为 R 反应。本实验海水的 pH 在 8.2 以上,基本处于较高的 pH 范围,臭氧应以 R 反应为主。

臭氧(O₃)是氧气(O₂)的同素异构体,在水中产生单原子氧(O)和羟基(OH)。单原子氧(O)和羟基(OH)能导致细菌的细胞溶解,杀菌消毒比氯高出几百倍。Meunpol^[4]认为臭氧杀菌程度取决于细菌第 1 次接触臭氧的浓度,较长时间的臭氧化不仅导致较久的胁迫,而且杀菌效果更大。但是,Maclean^[3]报道了臭氧浓度大于 0.5mg/L 对牡蛎幼体有害。Richardson^[5]报道,美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)的直线铰合面

盘幼虫对臭氧敏感性显然比稚贝高。Wedemeyer^[6]发现,低浓度臭氧若长时间处理育苗用水,可导致鱼的鳃瓣上皮细胞增生。因此,臭氧处理的效果取决于动物的敏感性、臭氧的接触时间和浓度。本研究表明,低浓度臭氧会提高西施舌幼虫成活率,幼虫的生长也较迅速。

3.3 西施舌幼虫对臭氧耐受与恢复

与未接触臭氧的对照组比较,充入臭氧(4.17 mg/L)时间持续 5~10 min,西施舌幼虫的生活状态良好,生长逐渐增加,成活率呈增加趋势;充入臭氧(4.17 mg/L)时间持续 15 min,7 d 后,幼虫成活率低于 50%。姜国良等^[9]的研究结果表明:中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)对臭氧的耐受力比牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)强,对虾在臭氧浓度 ≥ 1.0 mg/L 时,可存活至少 48 h,而牙鲆 3 h 后,鳃部出现充血肿胀、呼吸频率加快等不适应现象,若撤销臭氧之后,通入足量的氧气,接触过高浓度臭氧的牙鲆很快死亡。本实验还显示,随着充入臭氧次数的增加,西施舌幼虫的死亡率上升,若放回无臭氧的海水进行 17 h 和 30 h 的恢复,接触低浓度臭氧的西施舌幼虫死亡率逐渐增加,而接触高浓度臭氧的幼虫则比接触低浓度臭氧的死亡率更高,30 h 之后甚至达到 58%,说明西施舌的生理机能受到严重破坏,达到不可逆、不可恢复程度。

Coman 等^[2,7]先后报道了斑节对虾(*Penaeus monodon*)与日本对虾(*Penaeus japonicus*)胚胎适宜的臭氧处理浓度,斑节对虾后期胚胎耐受臭氧的质量浓度为 1.0 mg/L,持续 4 min,日本对虾胚胎耐受臭氧的质量浓度是 2 mg/L,时间 1 min。Ben-Atia 等^[8]认为,用臭氧消毒金头鲷(*Sparus aurata*)鱼卵,0.3 mg/L 臭氧处理鱼卵 2 min 是最适宜的。本研究表明,从水质的改善、西施舌胚胎孵化率考虑,臭氧(4.17 mg/L)处理 10 min 对西施舌胚胎适宜,从西施舌幼虫摄食、生长与成活来看,在此臭氧浓度下,臭氧处

理 7 min 对西施舌面盘幼虫摄食适宜, 臭氧处理 5~10 min 对西施舌幼虫的生长和成活有利。由此可见, 与对虾和鲷鱼相比, 西施舌胚胎和幼虫对臭氧具有更强的耐受能力。

参考文献:

- [1] 高如承. 西施舌生物学及人工育苗研究进展[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2006, 45(z2): 195-200.
- [2] Coman G J, Sellars M J, Morehead D T. Tolerance of *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* embryos to ozone disinfection[J]. *Aquaculture*, 2005, 245(1/4): 111-119.
- [3] MacLean S A, Longwell A C, Blogoslawski W J. Effects of ozone treated seawater on the spawned, fertilized, meiotic and cleaving eggs of the commercial American oyster[J]. *Mutation Research*, 1973, 21(5): 283-285.
- [4] Meunpol O, Lopinyosiri K, Menasveta P. The effects of ozone and probiotics on the survival of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. *Aquaculture*, 2003, 220(1): 437-448.
- [5] Richardson L B, Burton D T, Stavola A M. A comparison of ozone and chlorine toxicity to three life stages of the american oyster *Crassostrea virginica*[J]. *Mar Environ Res*, 1982, 6(2): 99-113.
- [6] Wedemeyer G A, Nelson N C, Yasutake W T. Physiology and biochemical aspects of ozone to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. *J Fish Res Board Can.* 1979, 36(6): 605-614.
- [7] Coman G J, Sellars M J. Tolerance of *Penaeus monodon* Fabricius embryos to ozonated seawater[J]. *Aquaculture Research*, 2007, 38(4): 420-428.
- [8] Ben-Atia I, Lutzky S, Barr Y, et al. Improved performance of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, larvae after ozone disinfection of the eggs[J]. *Aquaculture Research*, 2007, 38(2): 166-173.
- [9] 姜国良, 刘云, 杨栋, 等. 用臭氧处理海水对鱼虾的急性毒性效应研究[J]. 海洋科学, 2001, 25(3): 11-12.
- [10] Colberg P J, Lingg A J. Effect of ozonation on microbial fish pathogens, ammonia, nitrate, nitrite, and BOD in simulated reuse hatchery water[J]. *J Fish Res Board Can.* 1978, 35(10): 1290-1296.
- [11] 李宝华, 张素青, 叶红梅. 臭氧对海水育苗中水质理化指标的影响[J]. 现代渔业信息, 1999, 14(5): 21-25.

Effects of ozone treatment on embryo hatch rate, ingestion rate and growth and survival of *Coelomactra antiquata* larvae

GAO Ru-cheng, ZHUANG Hui-ru, WANG Yan-yin

(College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China)

Received: Jan., 12, 2007

Key words: ozone; *Coelomactra antiquata*; hatch rate; larvae; growth; survival

Abstract: The effects of ozone treated seawater on the hatch rate of *Coelomactra antiquata* embryos, the ingestion rate and growth as well as survival of the larvae were studied. The results showed that contents of COD and $\text{NH}_4^+\text{-N}$ in the experimental seawater after ozone treatment were significantly reduced. When embryos of the clam were treated by 4.17 mg/L ozone for 10 minutes, the hatch rate was up to 97%, while for 25 minutes, the hatch rate was a minimum of 72.7%. The larvae cultured respectively in seawater treated by 4.17 mg/L ozone from 10 minutes to 15 minutes and in untreated water grew faster. Survival of the larvae in the ozone treatments for 5 minutes and 10 minutes increased. When the larvae were cultured in high concentrations of ozone that was given several times to the seawater continuously and the larvae were placed back again in the seawater without ozone, and then reactivated for 17 hours and 30 hours, the result showed after 30 hours, the mortality of the larvae was 85%, while exposing to low concentrations of ozone, the mortality was a minimum of 33.3%. The result revealed that the physiological function of the larvae was destroyed by ozone treatment at irreversible state. (本文编辑: 康亦兼)