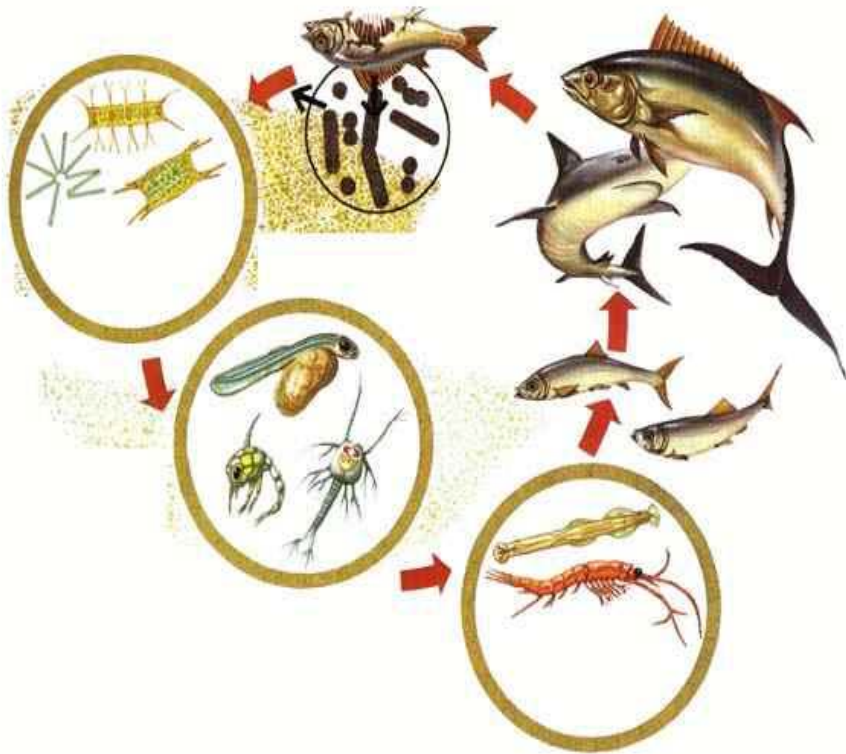


# 饵料与生态实验指导书

陈学豪 王雪虹 周立红

动物科学专业用



集美大学水产学院

2009年2月

# 目 录

实验操作守则 .....	1
实验报告要求 .....	1
实验一 生物饵料培养 .....	2
实验二 鱼虾的食料分析 .....	11
实验三 水产品中重金属残留的测定 .....	12
实验四 水产品中农药残留的测定 .....	15
实验五 浮游植物种间竞争 .....	18
实验六 盐度对海洋动物存活率的影响 .....	19

## 实验操作守则

1. 实验前必须仔细阅读实验指导书，明确实验目的、要求和内容，并写出预习报告。
2. 实验前要认真听取教师讲解，不要乱动仪器设备、药品。
3. 注意安全操作，特别小心使用电炉、烘箱、酒精灯等仪器及乙醚、丙酮等易燃药品。
4. 爱护仪器设备，节约水电、试剂。对精密仪器如电子天平、分光光度计等应先熟悉使用方法。
5. 实验室内应保持安静、清洁、整齐、严禁吸烟。
6. 实验结束后，应检查水电是否关闭。所用试剂、仪器物品妥当收放好，并整理干净。
7. 按时完成实验操作和实验报告。
8. 因操作不慎损坏仪器者，按学校规定处理赔偿。
9. 每位同学需按排位就座。

## 实验报告要求

每位同学要准备一本笔记簿。在做好每一个操作步骤的同时，随时把观察的情况及实验数据记录下来；记录数据不能随便涂改，实验后即整理记录，计算结果，写成书面报告，好的实验报告应是写得十分详尽和具科学性，文字端正而通顺。

实验报告格式：

### 一、预习报告要求：

1. 实验题目和日期
2. 实验的目地和意义：清楚扼要地叙述本次实验所要说明的问题；
3. 实验仪器和材料：点出本实验所用的仪器和材料；
4. 实验步骤：理出整个实验的操作步骤及顺序。

### 二、实验报告要求：

1. 实际操作步骤或过程：详尽叙述实验的操作过程及观察到的一切情况；
2. 实验结果：详尽记录所得数据，并将计算结果列表或绘成曲线；
3. 讨论与总结：应简要总结与概括所得结论及体会。

# 实验一 生物饵料培养

## 附：器皿的消毒与灭菌

### (一) 目的

1. 学习器皿的消毒与灭菌知识，并掌握其方法；
2. 清洗好实验用的器皿，为光合细菌和微藻的培养实验做好准备。

### (二) 器材 锥形瓶、烧杯、吸管、废报纸、试管刷、肥皂、硫酸、烘箱

### (三) 消毒与灭菌知识

#### 1. 消毒

消毒和灭菌的意义是有区别的，灭菌是指用物理或化学的方法杀死微生物，包括营养体和芽孢，当只杀死营养体而不杀死芽孢时叫消毒。生物饵料培养实验所用的容器、工具需要灭菌，而在一般生产的单种培养只要消毒就可以了。

(1) 加热消毒法：加热消毒法是利用高温杀死微生物的方法，不能耐高温的塑料、橡胶制品不能用此法消毒。

①直接灼烧消毒：接种环、镊子、试管口、瓶口等可直接在酒精灯火焰上短暂灼热消毒。

②煮沸消毒：把容器、工具放入锅中，加水煮沸消毒，一般在水中煮沸 10~20min，以大型的锥形瓶可在瓶内加进少量淡水，在瓶口放上漏斗，再在漏斗口放一称量瓶盖，加热煮沸 5~10min，让蒸汽在瓶中熏热消毒。

③烘箱消毒：将玻璃容器，金属工具洗涤干净后放入烘箱中，关闭烘箱门，打开通气孔，接通电源，加热，待温度上升至 140℃时关闭电源开关，等烘箱温度逐渐下降到 60℃以下，方可打开烘箱门，然后把消毒器皿用消毒纸逐一包装待用。

(2) 化学药品消毒法：在大规模培养光合细菌和微藻类的生产中，大型容器、工具及培养池一般常用化学药品消毒。

①漂白粉( $\text{CaOCl}_2$ )：工业上用的漂白粉一般含有效氯 25~35%，消毒时按万分之一到三 (100~300ppm) 的水溶液，把容器、工具在溶液中浸泡 30min，再用消毒水 (经过煮沸或沉淀过滤处理的水) 冲洗 3—4 次即成。白瓷砖池、水泥池的消毒可配成高浓度浆糊状的漂白粉溶液淋洒池壁与底部，30min 后用消毒水冲洗干净，24h 后方可接种微藻类。

②酒精( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ )：常用于小、中型容器与工具的消毒，方法是用纱布蘸 70% 酒精在容器、工具的表面涂抹，5min 后用消毒水冲洗 2 次即可。

③高锰酸钾( $\text{KMnO}_4$ )：把洗净的容器、工具放在万分之三 (300ppm) 的高锰酸钾溶液浸泡 5min，取出后用消毒水冲洗 2—3 次即成。白瓷砖池、水泥池可用高锰酸钾水溶液向池壁淋洒几遍，15min 后，再用消毒水冲洗干净。高锰酸钾必须当天配制当天使用，而且浸泡时间不宜超过 1h，否则留下的痕迹很难洗刷干净。

④石炭酸 (酚)：消毒时按 3~5% 的比例配成溶液，把洗涤清洁的容器、工具在溶液中浸泡 30min，再用消毒水冲洗 2—3 次即可。

#### 2. 灭菌

对任何培养基或器材进行灭菌，必须注意做到既要杀死所带的微生物，但又不能破坏它们的基本性质。为此，必须根据不同情况采用不同的灭菌方式。

##### (1) 干热灭菌法

①灼烧：接种环、镊子、试管口等可直接在酒精灯上灼烧，酒精灯燃烧时其周围的气温也随着升高，用于无菌操作。

②烘箱：把烘箱的温度调节到 160℃，并保持 2h 后可达到灭菌的目的。但含有水份的物质，如培养基等不能用此法灭菌。

#### (2) 温热灭菌法

①高压蒸汽灭菌：手提式高压灭菌锅是一个耐压的金属锅，在锅里盛 3L 的水后，把灭菌的物品（湿或干均可）置于消毒桶，并移入锅中的底架上，盖上锅盖并旋紧螺栓，打开放汽阀，在加热至放气阀白烟冒直时，关紧放气阀，待压力表指针指定 15 磅/英寸，并维持 15~30min 就可杀死一切微生物的营养体和芽孢。然后关掉电源，让其自然冷却至无压力时，方可打开锅盖取出物品。每次使用都得重新加水至 3L。

②间歇灭菌：在没有高压灭菌设备或在高温灭菌易破坏营养的情况下，用蒸汽锅（或普通锅）蒸锅至温度不超过 100℃，隔 24h 后再蒸煮，反复三次，能灭菌。

③过滤除菌：对于加热会变化的培养基或溶液，可用经灭菌的细胞过滤器。减压抽滤来除去其中含有的微生物。

④紫外线灭菌：波长 200~300nm 的紫外线具有杀菌作用，手术室、接种室和空气中微生物常用此法灭菌。

#### ⑤药物灭菌

A. 0.1% 升汞液用于器皿表面杀菌或实验后的废弃物处理。

B. 70~75% 的酒精，用于烧红冷却后的接种针、操作前或器具的表面杀菌。玻片、盖玻片的浸泡等。

C. 5% 新洁尔灭溶液稀释至万分之一到千分之一，用于工作环境和器皿表面的灭菌。

D. 40% 甲醛溶液用于空气熏蒸灭菌，将消毒空间密闭，维持 24h。

E. 5% 石炭酸（酚），用于处理器械或作喷雾消毒。

#### (四) 步骤

1. 清洗：把锥形瓶、烧杯等用肥皂水刷洗三遍，倒置架（桌）上凉干；

2. 酸洗：锥形瓶作为培养微藻类和光合细菌之用，为把旧瓶中的残留有机物破坏，需经一道酸洗工序，即把少许浓硫酸倒入干净瓶，小心倾斜转动，使硫酸遍布流经瓶内壁，然后倒入另瓶或回收，最后经 10 多遍自来水冲洗去酸，倒置架上凉干。

3. 消毒：将锥形瓶、烧杯放入烘箱，加热至 140℃，隔断电源，待冷却至 60℃ 左右，将锥形瓶用无菌纸（或棉塞）封口，套上橡皮筋，收藏待用。

#### (五) 作业

1. 以每 2 人为一组，洗涤 1 大瓶 2 小瓶。并收藏好消毒和灭菌后的器皿。

2. 写一份详细的实验报告。

**注意：** 洗涤要认真，洗后要检查。

## 一、光合细菌 (*Photo Synthetic Bacteria*) 的形态观察与培养

### (一) 目的

1. 观察光合细菌的形态特征；

2. 学习光合细菌的室内培养方法。

(二) 器材 电子天平、称量瓶、药匙、显微镜、载玻片、吸管、1000ml 和 50ml 三角烧瓶、蒸馏水（或海水）、光合细菌的培养材料、配方中的药品

### (三) 步骤

1. 培养基的配制：根据所培养的光合细菌的菌种不同，选用不同的水源配制培养基，如果菌种为淡水种，用自来水或蒸馏水配制；如果菌种为海水种，则用天然过滤海水配制。按培养基配方把所列物质称量（复合维生素 B 除外），混合溶解，再煮沸或灭菌，冷却后加入复合维生素 B，备用。

酵母膏	3g
蛋白胨	3g
CaCl <sub>2</sub>	0.3g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5g
蒸馏水（或海水）	1000ml
pH	6.8

2. 形态观察：先将光合细菌的培养材料摇匀，倒出少许于一小烧杯中，用吸管取 1 滴置于载玻片上，加上盖玻片，先在低倍镜下观察，后转至高倍镜下观察：小圆形且数量多，会缓慢运动。

3. 培养：将培养基装入 50ml 或 100ml 三角烧瓶（装 2/3），再将光合细菌种倒入三角烧瓶至满，摇匀，倒出少许于一小烧杯中，用血球计数板计数。用保鲜膜加橡胶圈密封。经 1~2 周培养即可见菌液颜色由橙黄色转变为红褐色，再计数。

4. 计数方法：将三角烧瓶摇匀后，倒出少许于一小烧杯中，用移液管取 1ml 置 25ml 或 50ml 烧杯中，加入蒸馏水 24ml 或 49ml 稀释，用血球计数板计数。

### (四) 作业

1. 试比较光合细菌与微藻类培养方法的不同之处，为什么？
2. 掌握光合细菌的培养方法。
3. 写一份详细的实验报告。

## 二、微藻的形态观察与培养

### (一) 饵料用微藻类的形态观察

#### 1、目的

- 1) 重新认识、学习显微镜的使用方法和描绘生物图；
- 2) 观察饵料用绿藻、金黄藻、硅藻类、蓝藻类的形态特征；

**2、器材** 显微镜、载玻片、盖玻片、吸管、常见饵料用微藻类、鲁哥氏（Lugol's）液（即碘液）等培养材料

#### 3、步骤

将各微藻种类的培养材料摇匀，用专用吸管取观察材料置于载玻片上 1—2 滴，慢慢盖上玻片，先在低倍镜下观察，后逐渐转至中倍和高倍镜下观察，在低倍镜下可观察到种类的大小轮廓、运动情况，然后在中倍镜下时，从盖玻片边缘加进半滴碘液，可以看到运动种类遇到碘液时随即死亡。最后在高倍镜下详细观察固定后的细胞形态特征。

- 1) 绿藻类：特征：色素体绿色，杯状。

①衣藻（*Chlamydomonas sp.*）：单细胞，卵形，细胞壁平清，细胞前端中央常有乳头

状突起，前端基部着生 2 条等长的鞭毛，鞭毛基部具 1—2 个伸缩泡，色素体 1 个，杯状，绿色，有蛋白核，色素体和碘的作用呈褐色至灰黑色，蛋白核呈暗紫至黑色。细胞核呈淡黄褐色，1 个眼点桔红色位于细胞一侧。

②亚心形扁藻 (*Platymonas subcordiformis*): 单生，体背部略隆起，腹平坦，前端较宽阔，中间有浅凹陷由基部处着生 4 条不等长的鞭毛，鞭毛要在较暗视野方能观察到，1 红色眼点位于蛋白核旁，蛋白核大型，向上开口。色素体绿色，杯状。在色素体外有细胞核 1 个。

③青岛大扁藻 (*P.helgolandica*): 形态特征与亚心形扁藻相似，只是个体比其大，且有多眼点的现象。

④盐藻 (*Dunaliella salina*): 单生，细胞梨形，前端着生 2 条长鞭毛 (比细胞长约 1/3)，色素体杯状，有 1 个具鞘的蛋白核，细胞核位于原生质中，眼点大，位于体的前端。

⑤蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*): 单生，细胞球形，具杯状色素体，蛋白核球形，细胞核位于中央。

2) 金黄藻类: 特征: 色素体褐色，侧生。

①湛江叉鞭金藻 (*Dicrateria zhanjiangensis*): 单生，细胞球形，具 2 条等长的鞭毛，且和细胞等长。色素体侧生，黄褐色。液泡 1—3 个，分散在细胞质中。细胞前端或后端常具 1 个白糖素体，白糖素与碘液不呈色，系白色不透明状。

②球等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*): 单生，无细胞壁，形状长椭圆形，具 2 条等长的长鞭毛约为细胞 1—2 倍，细胞运动缓慢，是其他运动种类所没有的特点。色素体 2 片，位置不固定，常是侧生、金黄色乃至褐色、1 个暗红色眼点位于中央位置。细胞核 1 个，中位。代谢产物的白糖体随个体生长而长大。

观察球等鞭金藻的群胶相。

③异胶藻 (*Heterogloea sp.*): 属黄藻类。单生，细胞长圆形，色素体 1 块，侧生，黄绿色。

3) 蓝藻类:

钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*): 细胞近方形，长 2~6 $\mu\text{m}$ 、宽 6~8 $\mu\text{m}$ ，藻丝由多细胞组成，兰绿色，横壁略收益。螺旋疏松，螺宽 26~36 $\mu\text{m}$ ，旋间距 43~57 $\mu\text{m}$ ，细胞内有颗粒体，横壁处无颗粒，末端细胞宽圆形。

4) 硅藻类: 特征: 色素体黄褐色，块状。

①三角褐藻 (*Phacodactylum tricorntun*): 细胞有三出放射形和棱形的，以前者的数量多，后者少，细胞中心部分有一个细胞核，有黄褐色的色素体 1—3 片。棱形细胞两端略钝，弯向同侧，形态同小新月菱形藻。在固体培养基内会出现卵圆形。

②小新月菱形藻 (*Nitzschia clesrtum*): 细胞壁壳面中央膨大，呈纺锤形，两端渐尖，皆朝同方向弯曲。色素体黄褐色 2 片，位于细胞中央的两侧。

③牟勒氏角毛藻 (*Chaetoceros muelleri*): 绝大多数是单生，偶有 2—3 个细胞组成群体，壳面椭圆至圆形，中央略凸或平坦。壳环呈长方形至四角形，壳环带不明显，角毛细而长，末端尖，自细胞角长出，几乎与纵轴平行，需调节光源在较暗视野可以看出，或角毛收缩。色素体 1 个，片状，黄褐色。

④简单钙质角毛藻 (*Chaetoceros simplex var. calcitrans*): 形态同牟勒氏角毛藻，只休眠孢壳上具有细小的刺，而牟勒氏角毛藻的休眠孢的初生壳和次生壳皆光滑无刺。

⑤中肋骨条藻 (*Skeletonema costatum*): 链状群体，细胞透镜形或圆柱形，壳面圆而

鼓起，着生一圈细长的刺与邻细胞的刺对应相接组成长链。色素体数目 1—10 个，通常 2 个，位于壳面。

⑥小形舟形藻 (*Navicula parva*): 单生，壳面有直的纵沟线和中结节，壳面直，纵沟也直。每个细胞有色素体 2—4 个。细胞壳环面长方形。

#### 4、作业

- 1) 要求会辨认各种常见微藻类。
- 2) 绘出观察藻类的形态图。

#### 附 1: 绘生物图的要点

1. 生物要选择具代表性或典型性。
2. 整个图需正立，大小比例适当。
3. 线条要直且粗细均匀。
4. 打点要园且分布均匀。

#### 附 2: 观察小型生物标本时使用显微镜要领

1. 光亮适当调暗，光圈打至最小。
2. 先在低倍镜下找到生物标本位置，可调至盖玻片边缘易观察到。
3. 转换至高倍镜下，用微调焦距找到生物标本后，再一手调微调，一手调聚光器，直至生物标本清晰为止。

#### 注意:

1. 每种微藻都要观察，不然下一个实验会受影响。
2. 实验报告：着重写：“结果分析与建议”。

### (二) 微藻类培养液的配制

1、目的 学习微藻培养母液和仿 F/2 培养液的配制。

2、器材 分析天平、药匙、容量瓶、蒸馏水、配方中的药品、电炉等

#### 3、步骤

1) 培养母液的配制

① 仿 F/2 培养液配方

A.	NaNO <sub>3</sub>	74.8mg/L	
B.	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.4mg/L	
C.	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	10mg/L	(硅藻、金藻用)
D.	FeC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> •3H <sub>2</sub> O	3.9mg/L	
E.	维生素 B <sub>1</sub>	0.2mg/L	
	维生素 B <sub>2</sub>	0.5μg/L	
F.	ZnSO <sub>4</sub>	23μ/L	
	MnCl <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O	178μg/L	
	CaCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	12μg/L	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	7.3μg/L	
	CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	10μg/L	
	Na <sub>2</sub> EDTA•2H <sub>2</sub> O	4.35μg/L	

②将上述配方中的药品扩大 1000 倍称取，按 A、B、C、D、E、F 分别置于 6 个烧杯



内，用蒸馏水溶解（注意： $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  需用研钵研碎后，再加热溶解），移入 1000ml 容量瓶内定容。

#### 2) 仿 F/2 培养液配制

用量筒量取过滤海水 4000ml，并按  $\text{N} \rightarrow \text{P} \rightarrow \text{Fe} \rightarrow$  微量元素顺序逐一加入各种营养母液各 4ml，加入一种母液后需摇匀一下，然后置电炉上煮沸，冷却即可。

### 4、作业

1) 分装：将培养液在 500ml 三角烧瓶中分装入 300ml，50ml 三角烧瓶中分装入 30ml。

2) 培养瓶上贴标签：取白纸一张，按下列写标签（用铅笔或炭素墨水笔），并用胶水贴于三角瓶中央处。

标签格式：

微藻分离（或培养）

学号：

日期：

3) 写一份详细的实验报告。

#### 注意：

1. 母液保存：营养母液可用 2~3 年（除维生素  $\text{B}_1$ 、 $\text{B}_{12}$  外）。
2. 在实际生产上只配制 N、P 和 Fe 三种营养母液，其比例为  $\text{NaNO}_3 : \text{KH}_2\text{PO}_4 : \text{FeCl}_3 = 50 \sim 100 : 5 \sim 10 : 1$ 。

### （三）微藻的分离与培养

#### 1、目的

- 1) 学习微藻的分离和培养方法；
- 2) 掌握拉毛细管和血球计数板的使用方法；
- 3) 观察微藻种群生长情况。

2、器材 酒精喷灯、 $\phi 5\text{mm}$  的玻璃管、50ml 和 500ml 三角瓶、滴管、蒸馏水、25ml 烧杯

#### 3、步骤

##### 1) 微藻种的分离

(1) 微吸管的制作：选  $\phi 5\text{mm}$  的玻璃管一根（约 15cm 长），在酒精喷灯上中部加热（起先慢慢转动），待熔后，快速拉成口径极细的微管。待冷却后，切掉前段细管直至有通孔。

(2) 将仿 f/2 培养液装入 50ml 和 500ml 的三角瓶中（装 3/5）。

(3) 分离培养：A. 从自然海区（潮间带小水洼）取回水样，在显微镜下观察，若有所要分离的藻种且数量多，可马上分离；若数量少，经为原 1/2 培养液浓度进行预培养后再分离；B. 取在实验室中已被混杂（2—3 种）的微藻混合种。

#### \*微藻的分离方法有：

①微吸管法：将要分离的藻液适度稀释，滴一滴置浅凹载玻片上，镜检，用微吸管挑选要分离的藻细胞，认真仔细地吸出放入另一浅凹载玻片上，镜检这一滴水中是否达到纯分离目的，如不成，反复几次直至达到分离目的为止，然后用滴管吸取少许培养液将这滴分离到的藻细胞冲入装有培养液的三角烧瓶中进行培养。

②水滴分离法：用微吸管取稀释适度的藻液，滴到消毒过的载玻片上，水滴尽可能小些，要求在低倍镜下能看到水滴的全部轮廓，一片载玻片滴一滴（如操作熟练可滴 2—4

滴，作直线间隔排列)，在显微镜下详细检查，若这一小滴内只有一种要分离的藻种，无其他生物混杂，即用吸管取少许培养液将这滴分离到的藻细胞冲入装有培养液的 50ml 三角瓶中去，若不成功，反复重做。

**\*要点：**A. 取微藻混合液 1~2ml，用培养液稀释，使之每小滴仅 1—2 个 C。

B. 用微细吸管垂直滴成小滴，即在低倍镜下全部看到整滴。

C. 要清楚辨认所要分离藻种，且观察过程需快速。

一般每个 50ml 三角烧瓶（装 1/2 培养液）冲入 5—10 个细胞，经两周的培养就可看到藻色。

## 2) 微藻类的培养

(1) 血球计数板的计数方法：血球计数板的中部有一部分比两边低 0.1mm，两边有沟，盖上盖玻片后其中间空间的厚距为 0.1mm。在中部划线内具大小方格，其中大方格的面积是  $1\text{mm}^2$ ，每个大方格分为 25 个中方格，每一中方格再分为 16 个小方格，即每个大方格共  $16 \times 25 = 400$  个小方格（也有一种计数板是 16 中格  $\times$  25 小格的，总数也是 400 个小方格）。

\*大方格的容积 =  $1\text{mm}^2 \times 0.1\text{mm}$ （厚）=  $0.1\text{mm}^3$ （ul）=  $10^{-4}\text{ml}$

把血球计数板及盖玻片用蒸馏水洗清，擦干，平放桌上，并盖好盖玻片。然后将藻液摇荡后倒少许于一个 25ml 小烧杯内（若会运动种类，需滴加数滴碘液或甲醛杀死），用一支干净的吸管吸取藻液，迅速把吸管口放到计数板旁的盖玻片边缘处，轻压橡皮头使藻液流入盖玻片内。注意控制藻液流入量，过多则流入沟内。过少则有气泡，过多过少的情况都得重做。稍停 1 分钟，待微藻细胞沉降到玻片表面，在低倍镜下计数 5 个方格（中央 1 格和四角 4 格）的细胞总数，如藻细胞数量少就计数整个大方格，藻细胞数量中等就计数 5 个中方格，藻细胞数量多就计数 5 个小方格。每个样品重复再计数一次，取平均值。按下式计算每 ml 藻液内所含的微藻细胞数。

$1\text{ml}$  水体微藻细胞数 =  $\frac{X_1 + X_2}{2 \times 5} \times 25$ （或 400） $\times 10000$ ，其中  $X_1$ 、 $X_2$  代表计数两次 5 个方

格的细胞总数。

在计数时常有细胞占在格线上，可自行规定为左与下线上的细胞不计数，在上与右线上的细胞要计数。如果计数前有稀释的，最后计算要乘上稀释倍数。

例：取 1ml 小球藻液，加 9ml 过滤海水稀释，在血球计数板上计算一大方格的细胞平均数为 31 个细胞，求 1ml 藻液中的小球藻数：

$31 \times 10000 \times 10 = 3100000$  个细胞/ml

## (2) 微藻的培养

①取出已消毒、贴好标签纸、注入煮沸冷却的仿 f/2 培养液 300ml 的 500ml 锥形瓶；

②在酒精灯旁（无菌室（箱）里）加进要培养种类的藻液（50~100ml）至淡色为度。

③计数：接种后摇匀，倒少许至小烧杯内，在血球计数板上计数其细胞密度，日后每 3 天计数一次，跟踪计数至藻类死亡期的出现。

④培养：在光照下培养一周后，计算藻细胞生长几倍。

## 4、作业

1) 以 2 人为一组，每位同学各分离 5 个藻细胞；

2) 以 2 人为一组培养一瓶微藻，但每位同学各自计数；

3) 写一份详细的实验报告。

### 三、轮虫的形态观察与培养

#### (一) 目的

1. 观察轮虫的形态特征、内部器官和摄食习性；
2. 进一步熟练掌握微藻个体计数法；学习轮虫的计数方法；
3. 学习褶皱臂尾轮虫 (*Braehionus Phicatilis*) 在实验室培养法；

(二) 器材 活体臂尾轮虫、小球藻 (*Chorella sp.*)、过滤海水、结晶皿、0.1ml 定量吸管、血球计数板、250ml 量筒、蒸馏水、载玻片与盖玻片、浆糊、标签纸、擦镜纸、纱布、显微镜、浮游动物计数框、碘液

(三) 轮虫的形态：用吸管吸取活体褶皱臂尾轮虫于单凹载玻片上，置低倍下观察轮虫的轮盘部、躯干部、足部、夏卵的形态和轮虫的运动，并回答下列问题：A. 所观察到的轮虫是雌体或雄体？每个雌体所带的夏卵数是否相等？B. 为什么时而看不到足部，时而又看到足部附着于载玻片上？C. 当加进一小滴墨水或微藻类后，在轮盘部前端看到的食物流是什么形状？在中倍镜下观察轮虫的消化、排泄、生殖、神经系统的器官构造，注意咀嚼器、焰细胞的运动方式。

- 1、用吸管吸干载玻片单凹内水，轮虫不会乱跑，观察轮虫的形态。
- 2、滴加碘液或甲醛杀死轮虫，轮盘部和足部将缩入体内，观察不到。

#### (四) 轮虫的培养

1、自轮虫活体培养材料中用 0.1ml 定量吸管吸取 2 次置入浮游动物计数框中，并加 1 滴碘液固定，计数 100 格中轮虫的数量（在低倍镜下），乘以 5 即为每 ml 轮虫数量或用已校正为 1ml 的吸管，水滴计数。

附：水滴数量计数法：先用已校正吸管吸取 1ml，后均匀地滴出并数准滴数，如 1ml=X 滴，每次取 1 滴即  $\frac{1}{X}$  ml，计数  $\frac{1}{X}$  ml 中轮虫数量（取 5—10 滴算平均数），然后乘以 X 倍，即为 1ml 中轮虫的数量；或全部数 1ml 的数量（边挤边数）。

2、用血球计数板计数小球藻中每 ml 所含的细胞数量。

3、在 500ml 结晶皿中分别放置 300ml 过滤海水，并定量投放小球藻（100~200 万个 C/ml）作为饵料，最后再分别定量接种轮虫（30 个/ml）于结晶皿的培养液中，定量投放饵料和轮虫的水样体积加上 300ml 过滤海水为总水体积，从已知饵料密度和轮虫密度，计算总水体中轮虫、饵料的密度，贴上标签。

标签格式：

培养动物名称：	动物密度：	个/毫升
投饵料种类：	饵料密度：	个/毫升
培养时间：		培养者：

4、培养期间，每天必须定时记录气温与水温，检查轮虫的生活情况，以不下沉和数量增加为好，适时追加饵料，抽样计数时，当轮虫达 200 个/ml 以上，可以再扩大培养。

#### (五) 注意事项

- ①培养皿务必清洗干净。
- ②蒸馏水、碘液、轮虫和各种饵料所用吸管必须专用；
- ③血球计数板与浮游动物计数框每用完后，需用蒸馏水冲洗干净，用纱布纸揩干。

## （六）作业

1. 描绘臂尾轮虫的形态特征图；
2. 掌握轮虫的培养方法；
3. 写一份详细的实验报告。

## 四、卤虫卵的质量鉴别与卤虫无节幼体和成体形态观察

### （一）目的

1. 学习卤虫卵的鉴别和孵化方法；
2. 观察卤虫无节幼体的形态特征。

（二）器材 卤虫卵、过滤海水、载玻片与盖玻片、浆糊、标签纸、擦镜纸、纱布、显微镜、碘液

### （三）卤虫卵质量鉴别：

**例：**某对虾育苗场要购买一批卤虫卵，但不知这批卤虫卵的质量如何。委托我们对这批卤虫卵进行质量鉴定。

根据你已学的知识，设计出若干个实验来鉴定这批卤虫卵的质量好坏。并写出这批卤虫卵的质量鉴定报告。

（四）卤虫无节幼体形态观察：在鉴定实验中孵化的卤虫无节幼体用吸管取出，置于单凹载玻片上观察，可看到眼点、第 1、2 触角和大颚等。

### （五）作业

1. 描绘卤虫无节幼体的形态特征图；
2. 卤虫卵的质量鉴定报告。

## 实验二 鱼虾的食料分析

一、目的 学习鱼类食料分析的一般方法。

### 二、材料与仪器

1. 稜鲮 (*Mugilearinatus*)
2. 解剖刀、剪刀、解剖盘、直尺、蒸馏水滴瓶、吸管、盖玻、载玻片

### 三、步骤

#### 1. 摄食等级的观察

用纱布吸干稜鲮体表的水份，然后利用尺子测量其吻端至尾椎末端的体长，解剖后取出自咽喉至肛门的消化道，理顺消化道并测量其总长度，剪开各段消化道，用眼力鉴别各段消化道，确定摄食等级，按食道、胃、肠（无胃动物按前肠、中肠、后肠）用三个数字表示：如 134。

- |            |                    |
|------------|--------------------|
| 0 级——空无食物； | 3 级——食物中等多；        |
| 1 级——食物稀少； | 4 级——食物饱满，肠壁不膨胀；   |
| 2 级——食物少量； | 5 级——食物饱满，肠壁膨胀无褶皱。 |

2. 食物种类出现频率的计算：小心将胃容物分散在少许蒸馏水里，搅匀后取 1—2 滴置于载玻片上，加盖玻片后在显微镜下鉴定食料种类，依食料的残渣余片所能鉴定的特征，登记每一视野中所出现的全部种类，在第二视野所出现的相同种类用累加统计，并用下式计算其出现频率：

$$\text{食料种类的出现频率} = \frac{\text{某种类出现的视野数}}{\text{鉴定的全部视野数}} \times 100\%$$

这种出现频率的计算，随着取样量越多和所鉴定的视野数越多，越是接近客观情况。

### 四、作业

1. 完成附表所填写的内容。

附表 1 鱼的摄食强度

鱼名	体长(cm)	肠长 (cm)	肠与体长比	摄食等级

附表 2 鱼类的食料组成

体长 (厘米)	体重 (克)	性别	采集地	日期
食料种类	出现视野数	鉴定总视野数	出现频率	

2. 写一份详细的实验报告。

## 实验三 水产品中重金属残留的测定

### 一、实验目的

1. 了解原子吸收光谱仪的基本组成部件；
2. 熟悉原子吸收光谱仪的操作技术；
3. 掌握石墨炉原子吸收法测定水产品中 Cd 的方法；
4. 学习水产品试样的前处理技术。

### 二、实验要求

1. 掌握原子吸收光谱仪的使用方法和注意事项；
2. 学习使用校正曲线法进行定量分析；

### 三、实验原理

试样经灰化或酸消解后，注入原子吸收光谱仪的石墨炉中，电热原子化后吸收 228.8nm 共振线，在一定浓度范围，其吸收值与镉含量成正比，与标准系列比较定量。

### 四、试剂

分析过程中全部用水均使用去离子水，所使用的化学试剂均为优级纯或分析纯。

1. 硝酸。
2. 过氧化氢(30%)。
3. 高氯酸。
4. 硝酸(1+5)：取 50ml 硝酸，慢慢加入 250ml 水中。
5. 硝酸(0.5mol/L)：取 3.2ml 硝酸，加入 50ml 水中，稀释至 100ml。
6. 混合酸：硝酸+高氯酸(4+1)。取 4 份硝酸与 1 份高氯酸混合。
7. 磷酸铵溶液(20g/L)：称取 2.0g 磷酸铵，以水溶解稀释至 100ml。
8. 镉标准储备液：此溶液每毫升含 1.0mg 镉。
9. 镉标准使用液：每次吸取镉标准储备液 10.0ml 于 100ml 容量瓶中，加硝酸(0.5mol/L)至刻度。如此经多次稀释成每毫升含 100.0ng 镉的标准使用液。

### 五、仪器

所用玻璃仪器均需以硝酸(1+5)浸泡过夜，用水反复冲洗，最后用去离子水冲洗干净。

1. 原子吸收光谱仪(附石墨炉及镉空心阴极灯)
2. 马弗炉
3. 恒温干燥箱
4. 瓷坩埚
5. 压力溶弹
6. 电热板
7. 匀浆机
8. 试样：

本试验用各种鲜、活水产品

沙丁鱼（海水鱼类）、日本对虾（海水虾类）、青蟹（海水蟹类）、文蛤（海水贝类）、鱿鱼（其他海水动物）等。

草鱼（淡水鱼类）、日本沼虾（淡水虾类）、中华绒螯蟹（淡水蟹类）、河蚬（淡水贝类）、牛蛙（其他淡水动物）等。

## 六、分析步骤

### 1. 试样预处理

(1) 在采样和制备过程中，应注意不使试样污染。

(2) 将鲜活水产品，用去离子水洗净，用滤纸吸干表面水分，取可食用部分用匀浆机打成匀浆，储于塑料瓶中，保存备用。

### 2. 试样消解(每组选用一种方法消解)

(1) 压力消解罐消解法：称取 1.00~2.00g 试样(干样、含脂肪高的试样少于 1.00g，鲜样少于 2.0g 或按压力消解罐使用说明书称取样品)于聚四氟乙烯内罐，加硝酸 2~4ml 浸泡过夜。再加过氧化氢(30%)2~3ml(总量不能超过罐容积的三分之一)。盖好内盖，旋紧不锈钢外套，放入恒温干燥箱，120~140℃保持 3~4h，在箱内自然冷却至室温，用滴管将消化液洗入或过滤入(视消化液有无沉淀而定)10~25ml 容量瓶中，用水少量多次洗涤罐，洗液合并于容量瓶中并定容至刻度，混匀备用；同时作试剂空白。

(2) 干法灰化：称取 1.00~5.00g(根据镉含量而定)试样于瓷坩埚中，先小火在电热板上炭化至无烟，移入马弗炉 500℃灰化 6h~8h 时，冷却。若个别试样灰化不彻底，则加 1ml 混合酸在电热板上小火加热，反复多次直到消化完全，放冷，用硝酸(0.5mol/L)将灰分溶解，用滴管将试样消化液洗入或过滤入(视消化液有无沉淀而定)10~25ml 容量瓶中，用水少量多次洗涤瓷坩埚，洗液合并于容量瓶中并定容至刻度，混匀备用；同时作试剂空白。

(3) 过硫酸铵灰化法：称取 1.00~5.00g 试样于瓷坩埚中，加 2~4ml 硝酸浸泡 1h 以上，先小火炭化，冷却后加 2.00~3.00g 过硫酸铵盖于上面，继续炭化至不冒烟，转入马弗炉，500℃恒温 2h，再升至 800℃，保持 20min，冷却，加 2~3ml 硝酸(1.0mol/L)，用滴管将试样消化液洗入或过滤入(视消化液有无沉淀而定)10~25ml 容量瓶中，用水少量多次洗涤瓷坩埚，洗液合并于容量瓶中并定容至刻度，混匀备用；同时作试剂空白。

(4) 湿式消解法：称取试样 1.00~5.00g 于高脚烧杯中，放数粒玻璃珠，加 10ml 混合酸，加盖浸泡过夜，加一小漏斗在电热板上消解，若变棕黑色，再加混合酸，直至冒白烟，消化液呈无色透明或略带黄色，放冷用滴管将试样消化液洗入或过滤入(视消化液有无沉淀而定)10~25ml 容量瓶中，用水少量多次洗涤高脚烧杯，洗液合并于容量瓶中并定容至刻度，混匀备用；同时作试剂空白。

### 3. 测定

(1) 仪器条件：根据各自仪器性能调至最佳状态。参考条件为波长 228.8nm，狭缝 0.5~1.0nm，灯电流 8~10mA，干燥温度 120℃，20s；灰化温度 350℃，15~20s，原子化温度 1700~2300℃，4~5s，背景校正为氘灯或塞曼效应。

(2) 标准曲线绘制：吸取上面配制的镉标准使用液 0.0、1.0、2.0、3.0、5.0、7.0、10.0ml 于 100ml 容量瓶中稀释至刻度，相当于 0.0、1.0、2.0、3.0、5.0、7.0、10.0ng/ml，各吸取 10μl 注入石墨炉，测得其吸光值并求得吸光值与浓度关系的一元线性回归方程。

(3) 试样测定：分别吸取样液和试剂空白液各 10μl 注入石墨炉，测得其吸光值，代入标准系列的一元线性回归方程中求得样液中镉含量。

(4) 基体改进剂的使用：对有干扰试样，则注入适量的基体改进剂磷酸铵溶液(20g/L)(一般为少于 5μl)消除干扰。绘制镉标准曲线时也要加入与试样测定时等量的基体改进剂磷酸铵溶液。

## 七、结果计算

试样中镉含量按下式进行计算。

$$X = \frac{(A_1 - A_2) \times V \times 1000}{m \times 1000}$$

式中：X——试样中镉含量， $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；

$A_1$ ——测定试样消化液中镉含量， $\text{ng}/\text{ml}$ ；

$A_2$ ——空白液中镉含量， $\text{ng}/\text{ml}$ ；

V——试样消化液总体积， $\text{ml}$ ；

m——试样质量， $\text{g}$ 。

计算结果保留两位有效数字。

#### 八、精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 20%。



## 实验四 水产品中农药残留的测定

### 一、实验目的

1. 了解气相色谱仪的基本组成部件；
2. 熟悉气相色谱仪的操作技术；
3. 掌握用气相色谱仪测定水产品中有机农药的方法；

### 二、实验要求

1. 掌握气相色谱仪的使用方法和注意事项；
2. 学习使用外标法进行定量分析；

### 三、实验原理

试样经与无水硫酸钠一起研磨干燥后，用丙酮—石油醚提取农药残留，提取液经氟罗里硅土柱净化，净化后样液用配有电子捕获检测器的气相色谱仪测定，外标法（工作曲线法）定量。用保留时间定性。

### 四、试剂和材料

所用试剂除注明外均为分析纯，水为蒸馏水。

1. 丙酮：重蒸馏。
2. 石油醚：沸程 60—90℃。经氧化铝 3.3.2 柱净化后用全玻璃蒸馏器蒸馏，收集 60—90℃馏分。
3. 乙醚：重蒸馏。
4. 乙醚—石油醚淋洗溶液：15+85。
5. 无水硫酸钠：650℃灼烧 4h，冷却后，储于密闭容器中。
6. 氧化铝：层析用，中性，100—200 目，800℃灼烧 4h，冷却至室温储于密闭容器中，备用。使用前，应在 130℃干燥 2h。
7. 氟罗里硅土：60—100 目，650℃灼烧 4h，冷却后储于密闭容器内备用。使用前，应在 130℃干燥 1h。

注：每批氟罗里硅土用前应做淋洗曲线。

### 8. 有机氯农药标准品：

$\alpha$ -BHC、 $\beta$ -BHC、 $\gamma$ -BHC、 $\delta$ -BHC、 $o,p'$ -DDT、 $p,p'$ -DDT、 $p,p'$ -DDD、 $p,p'$ -DDE 标准品，纯度均 $\geq 99\%$ 。

9. 8 种有机氯农药标准溶液：准确称取适量的每种农药标准品，分别用少量苯溶解，然后用石油醚配成浓度各为 0.100mg/ml 的标准储备溶液。根据需要再以石油醚配制成适用浓度的混合标准工作溶液。

### 五、仪器和设备

1. 仪器：气相色谱仪为 Agilent 6890N
2. 色谱柱：HP-5 弹性石英毛细管色谱柱，长为 30m，内径为 0.32 mm
3. 检测器：ECD
4. 氧化铝净化柱：300mm×20mm（内径）玻璃柱，装入氧化铝 40g，上端装入 10g 无水硫酸钠干法装柱，流量为 2ml/min。

注：该柱可连续净化处理石油醚 1000ml。

5. 氟罗里硅土净化柱：200mm×20mm（内径）玻璃柱，装入氟罗里硅土 13g，上端装

入 5g 无水硫酸钠干法装柱，使用前用 40ml 石油醚淋洗。

6. 索氏提取器：250ml。

7. 绞肉机。

8. 全玻璃蒸馏装置

9. 玻璃研钵：口径 11.5cm。

10. 氮吹仪

11. 微量注射器：10 $\mu$ l。

12. 脱脂棉：经过丙酮—石油醚（2+8）混合液抽提 6h 处理过。

## 六、试样制备和保存

将抽取的试样去鳞、去骨、去内脏后，将所有可食部分充分搅碎和混合。用四分法缩分出 1kg，均分为二份，分别装入洁净容器内，作为试样。密封，并标明标记。

将试样于 -18 $^{\circ}$ C 以下冷冻保存。

注：在抽样和制样的操作过程中，必须防止样品受到污染或发生残留量的变化。

## 七、测定步骤

### 1. 提取

称取试样 10.0g（精确至 0.1g）于研钵中，加 15g 无水硫酸钠研磨几分钟；将试样制成干松粉末，装入滤纸筒内。放入索氏提取器中，在提取器的瓶中加入 100ml 丙酮—石油醚（2+8）混合液，在水浴上提取 6h（回流速度每小时 10—12 次），将提取液减压或氮气流浓缩至约 5ml。

### 2. 净化

将上述提取液全部移入氟罗里硅土净化柱中，弃去流出液，注入 200ml 乙醚—石油醚淋洗液进行洗脱。开始时，取部分乙醚—石油醚混合液反复清洗提取瓶，并把洗液注入净化柱中。

洗脱流速为 2—3ml/min，收集流出液于 250ml 蒸发瓶中，在减压或氮气流中浓缩并定容至 10ml，供气相色谱测定。

### 3. 测定

#### （1）色谱条件

色谱仪：Agilent 6890N

仪器控制及数据采集：Agilent 化学工作站

进样口：分流/不分流进样口

进样口温度：240 $^{\circ}$ C

进样方式：不分流进样

进样体积：1 $\mu$ l

吹扫时间：0.75min

色谱柱：HP-5 30m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25 $\mu$ m

载气：氮气，1.2ml/min

柱箱：60 $^{\circ}$ C 保持 1min，30 $^{\circ}$ C/min 升至 180 $^{\circ}$ C，5 $^{\circ}$ C/min 升至 250 $^{\circ}$ C，保持 5min，3 $^{\circ}$ C/min 升至 280 $^{\circ}$ C，保持 10min

检测器：微池电子捕获检测器（micro-ECD），300 $^{\circ}$ C

尾吹气：氮气，60mL/min

#### （2）色谱测定

根据样液中有机氯农药种类和含量情况，选定峰高相近的相应标准工作混合液，标准工作混合液和样液中各有机氯农药响应值均应在仪器检测线性范围内，对标准工作混合液和样液等体积参插进样测定。

### (3) 空白试验

除不加试样外，均按上述测定步骤进行。

## 八、结果计算和表述

用色谱工作站或按下式计算试样中各有机氯农药残留量：

$$X_i = \frac{h_i \times c \times V}{h_{is} \times m}$$

式中： $X_i$ ——试样中各有机氯农药残留量，mg/kg

$h_i$ ——样液中各有机氯农药的峰高，mm

$h_{is}$ ——标准工作溶液中各有机氯农药的峰高，mm

$c$ ——标准工作溶液中各有机氯农药的浓度， $\mu\text{g/ml}$

$V$ ——最终样液的体积，ml

$m$ ——称取试样量，g

注：计算结果需扣除空白值。

## 九、方法的回收率

回收率的实验数据：

农药名称	添加浓度，mg/kg	回收率，%
$\alpha$ -BHC	0.01	
	0.05	
$\gamma$ -BHC	0.01	
	0.05	
$\beta$ -BHC	0.01	
	0.05	
$\delta$ -BHC	0.01	
	0.05	
p,p`-DDE	0.04	
	0.2	
o,p`-DDT	0.05	
	0.25	
p,p`-DDT	0.05	
	0.25	
p,p`-DDD	0.05	
	0.25	

## 实验五 浮游植物种间竞争

### 一、实验目的

通过不同种类浮游植物混合培养，观察不同种群增长速率的差异、混合种群在生长竞争中的种类更替过程，分析环境因子如营养盐等在浮游植物种间竞争中所起的作用。

### 二、原理

将单独培养在某一特定环境中均能正常生活的几种浮游植物混合培养在相同环境中，由于存在对空间、营养盐等的竞争，不同种类生长状况不同。竞争力强、繁殖快的种类将因数量优势而逐渐淘汰竞争力弱、繁殖慢的种类，从而出现明显的种类更替。

### 三、仪器与设备

1. 显微镜
2. 浮游植物计数框
3. 温控仪
4. 生化培养箱
5. 折射盐度计
6. 托盘天平
7. 酸度计
8. 手提式压力蒸汽消毒器

### 四、药品与试剂

NaCl、MgSO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、尿素等

### 五、实验材料：

扁藻、小球藻、塔玛亚历山大藻、金藻、三角褐指藻、骨条藻、角毛藻等

### 六、实验步骤

1. 培养器具的准备：以 500ml 或 1000ml 的三角烧瓶为培养瓶，洗净后用手提式压力蒸汽消毒器高压灭菌待用。

2. 培养条件：培养环境（温度、盐度、光强、pH 值等）的设置应使所选种类在单独培养时能正常生长，在此基础上探讨营养盐含量对浮游植物种间竞争的影响：可通过添加人工海水稀释和添加不同体积的 f/2 培养液设置低、中、高三个营养盐梯度。

3. 接种：选择 3~4 种上述培养材料混合，使各种群数量基本相等，将混合种群以相等体积接种于各培养瓶中。同时将各种群以相近数量分别接种于三个营养盐梯度的培养瓶中以作对照。

4. 计数：自接种时开始，每隔 24h 定时计数，计数时先将藻液充分摇匀，取样后以血球计数板或浮游植物计数框于显微镜下计数，数据填入下表。

5. 数据处理：根据计数结果，了解种类更替状况，并以培养时间（t）为横坐标，种群数量（N<sub>t</sub>）为纵坐标，绘制各种群单独培养和混合培养时的数量变化曲线，对所选种类的竞争试加分析。

种群 密度 时间	混合培养				单独培养			
	A	B	C	D	A	B	C	D
起 始								
24 h								
48 h								
72 h								
96 h								

## 实验六 盐度对海洋动物存活率的影响

### 一、实验目的

1. 以不同盐度梯度和变化速率进行实验，了解广盐性和狭盐性海洋动物对盐度的适应能力。

2. 掌握盐度与比重的相互关系，学会海水比重、盐度测定方法。

### 二、原理

盐度是海水总含盐量的度量单位，海水盐度最低可小于 0.5（河口），最高可超过 40（红海）。受渗透压调节能力的限制，海洋生物对海水盐度的变化有一适应范围，根据适应范围的大小，可分为狭盐性生物和广盐性生物二类。狭盐性生物对盐度变化很敏感，只能生活在盐度稳定的环境中，广盐性生物对海水盐度的变化有很大的适应性，能忍受海水盐度的剧烈变化。不同种类海洋生物对盐度变化适应能力的差异由遗传所决定，不同种类、同一种类不同发育阶段和雌雄个体适应能力也不同。另外，水温、溶解氧等其他环境因子是否处于适宜范围也影响海洋生物对盐度变化的适应能力。

### 三、仪器与设备

1. 折射盐度计 2. 比重计 3. 充气机 4. 培养缸等玻璃仪器 5. 托盘扭力天平

### 四、药品与试剂：

NaCl、MgSO<sub>4</sub>、NaHCO<sub>3</sub> 等

### 五、实验材料：

鱼、对虾、贝类等

### 六、实验步骤

1. 以 1000ml 烧杯为培养容器，以取自培养动物栖息水域的天然过滤海水为母液，用蒸馏水和 NaCl 等试剂配制成盐度范围 0~40、盐度梯度为 5 的培养液，同时使水温等其他环境因子保持在培养动物的适宜范围内。

2. 每只烧杯中分别放入对虾仔虾幼体约 10 只，并加入适量丰年虫无节幼体为饵料，适量充气培养。试验期间注意观察各培养瓶中对虾幼体的活动和存活情况，并于 24h 后计算各试验组的死亡率。确定对虾幼体的耐受极限（试验期内有 50% 的个体死亡）和适宜生存的盐度范围。

盐度 (‰)	0	5	10	15	20	25	30	35	40
死亡率 (%)									

3. 以耐受极限为最终培养盐度，设置不同的盐度变化速率，分别以每小时 2‰和 5‰的变化梯度，从天然海水的盐度增加（减少）至耐受极限，观察不同盐度变化速率下对虾幼体的活动和存活状况。