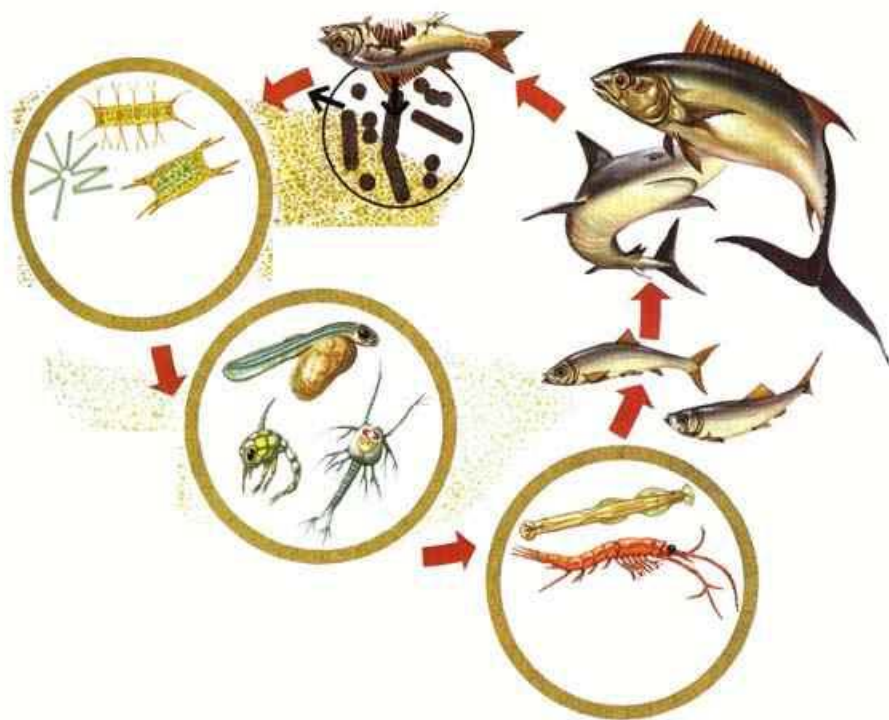


# 综合实验指导书

陈学豪 王雪虹 周立红 编

水产养殖学专业用



集美大学水产学院

2009年3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 水产饲料的配制原理 .....	12
实验四 水中碱度（总碱度、重碳酸盐和碳酸盐）的测定 .....	13
实验五 水中硝酸盐氮含量的测定 .....	16
实验六 水中活性磷含量的测定 .....	20
实验七 水中化学耗氧量的测定 .....	22
实验八 水产品中重金属残留的测定 .....	24
实验九 水产品中农药残留的测定 .....	27
实验十 盐度对海洋动物存活率的影响 .....	30
实验十一 温度对海洋动物发育速率和孵化率的影响 .....	31
实验十二 温度对海洋动物呼吸速率的影响 .....	32
实验十三 群落多样性的测定 .....	36

## 实验操作守则

1. 实验前必须仔细阅读实验讲义，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。最后在高倍镜下仔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。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, 末端细胞宽园形。

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园形。

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. 打点要圆且分布均匀。

##### 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 N→P→Fe→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 1mm<sup>2</sup>，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 16×25=400 个小方格（也有一种计数板是 16 中格×25 小格的，总数也是 400 个小方格）。

\*大方格的容积 = 1mm<sup>2</sup>×0.1mm（厚）=0.1mm<sup>3</sup>（ul）=10<sup>-4</sup>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。

1ml 水体微藻细胞数 =  $\frac{X_1 + X_2}{2 \times 5} \times 25$  (或 400) × 10000，其中 X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub> 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：

31×10000×10=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 水产饲料的配制原理

## 附：各类型配合饲料的物理性状观察

### 一、目的

1. 学习水产动物配合饲料的配制原理；
2. 认识各类型配合饲料的物理性状。

**二、器材** 解剖盘、药匙、研钵、500ml 量筒、电子天平、粉碎机、绞肉机、饲料原料和水产配合饲料

### 三、步骤

#### (一) 配合饲料的配制原理

1. 粉碎：将下面各原料在研钵或粉碎机中分别研碎成细末，利用 40 目的筛子过筛。然后按下列配方量称取。

鱼粉	40g
黄豆粉	20g
面粉	30g
$\alpha$ -淀粉	10g

2. 混合：将称取的各原料倒入解剖盘用药匙搅匀，或再经粉碎机粉碎一次即达到混合的目的；

3. 加工：按原料与水 2: 1 的比例，在混合物中加进约 50ml 水，边加水边调均匀。把原料混合物集中，用绞肉机加工成条状，由解剖盘接料，送至烘箱中加热至 80℃ 烘干，即为配合饲料。

#### (二) 配合饲料物理性状观察

1. 水产配合饲料物理性状的一般质量鉴别：

- (1)看：色泽一致、大小一致、无结块、无虫害；
- (2)闻：无异味、无发霉；
- (3)尝：甜味；
- (4)手搓与捏：细度和大小一致，手捏后放开不结块；

2. 鳗鱼粉状饲料粘弹性的观察：称取鳗料 50g 置 250ml 烧杯内，按 1: 1.2 比例加水，用玻棒或手做成团状，然后用两手拉开，观察其粘性和弹性，粘性好拉得长不易断，且不粘后，弹性好有韧性。

3. 海水鱼浮性颗粒饲料水中稳定性的观察：取 10—20 粒鱼浮料放入装有自来水的烧杯中，应全部上浮，浸泡约 30min 后，用手捏一颗粒，观察颗粒的弹性如何？是否会反弹、或中裂、或破碎等。

4. 对虾颗粒饲料水中稳定性的观察：取 10—20 粒对虾配合饲料置装有自来水的烧杯内，2h 后观察饲料颗粒是否溃散。若 2h 边缘有溃散，水中稳定性差；3-4h 后还不溃散颗粒太硬，对虾啃不动。

### 四、作业

1. 接单双号分 3-5 组进行配制，但每位同学必须参与；
2. 掌握配合饲料的配制方法；
3. 每位同学必须观察各种配合饲料的物理性状；
4. 写一份详细的实验报告。

## 实验四 水中碱度（总碱度、重碳酸盐和碳酸盐）的测定

### 一、实验目的

掌握水中碱度测定的实验方法、原理和分析技术。

### 二、实验要求

掌握酸滴定法测定水的碱度的方法和技术。

### 三、方法原理

水样用标准酸溶液滴定至规定的pH值，其终点由加入的酸碱指示剂在该pH值时颜色的变化来判断。当滴定至酚酞指示剂由红色变为无色时，溶液pH值即为8.3，指示水中氢氧根离子已被中和，碳酸盐均变为重碳酸盐；当滴定至甲基橙指示剂由淡桔黄色变成桔红色时，溶液的pH值为4.4~4.5，指示水中的重碳酸盐（包括原有的和由碳酸盐转化成的）已被中和。根据上述两个终点到达时所消耗的盐酸标准滴定溶液的量，计算出水中碳酸盐、重碳酸盐含量及总碱度。

### 四、仪器

1. 酸式滴定管：25ml。
2. 锥形瓶：250ml。
3. 移液管：5ml、20ml。

### 五、试剂

#### 1. 无二氧化碳水

用于制备标准溶液及稀释用的蒸馏水或去离子水，临用前煮沸15min，冷却至室温。pH值应大于6.0，电导率小于0.2mS/m。

#### 2. 0.1mol/L氢氧化钠溶液

取氢氧化钠适量，加水振摇使溶解成饱和溶液，冷却后，置聚乙烯塑料瓶中，静置数日，澄清后备用。取澄清的氢氧化钠饱和溶液 5.6ml，加新沸过的冷水使成 1000ml，摇匀。

#### 3. 酚酞指示液

称取0.5g酚酞溶于100ml95%乙醇中，用0.1mol/L氢氧化钠溶液滴至出现淡红色为止。

#### 4. 甲基橙指示液

称取0.1g甲基橙溶于100ml蒸馏水中。

#### 5. 碳酸钠基准溶液：C(1/2Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)=0.0250mol/L

称取1.3249g（于180℃烘干2h）的基准无水碳酸钠，溶于少量无二氧化碳水中，移入1000ml容量瓶中，用水稀释至标线，摇匀。贮于聚乙烯瓶中，保存时间不要超过一周。

#### 6. 盐酸标准滴定溶液：C(HCl)=0.0250mol/L

用分度吸管吸取2.1ml浓盐酸（ρ=1.19g/mL），并用无二氧化碳水稀释至1000ml，此溶液浓度约为0.0250mol/L。其准确浓度按下法标定：

用无分度吸管吸取20.00ml碳酸钠基准溶液于250ml锥形瓶中，加无二氧化碳水稀释至约100ml，加入3滴甲基橙指示液，用盐酸标准滴定溶液滴定至由桔黄色刚变成淡桔红色，记录盐酸标准滴定溶液用量。按下式计算其准确浓度：

$$C = \frac{20.00 \times 0.0250}{V} \quad (1)$$

式中：C——盐酸标准滴定溶液浓度，mol/L；

V——盐酸标准滴定溶液用量，ml。

## 六、实验步骤

1. 分取100 ml水样于250 ml锥形瓶中作为试样，加入4滴酚酞指示液，摇匀。当试样呈红色时，用盐酸标准滴定溶液（0.0250mol/L）滴定至刚刚褪至无色，记录盐酸标准滴定溶液（0.0250mol/L）用量。若加酚酞指示剂后试样无色，则不用盐酸标准溶液滴定，并接着进行下项操作。

2. 向上述锥形瓶中加入3滴甲基橙指示液，摇匀。继续用盐酸标准滴定溶液（0.0250mol/L）滴定至试样由桔黄色刚刚变为淡桔红色为止，记录盐酸标准滴定溶液（0.0250mol/L）用量。

## 七、结果表示

对于多数天然水样，碱性化合物在水中所产生的碱度，有五种情形。为说明方便，令以酚酞作指示剂时，滴定至颜色变化所消耗盐酸标准溶液的量为P（ml），以甲基橙作指示剂时盐酸标准滴定溶液用量为M（ml），T为盐酸标准滴定溶液总消耗量，即（P+M），则水中的碱度组成在表1中给出。

表1 水中的碱度组成

滴定结果	氢氧化物碱度	碳酸盐碱度	重碳酸盐碱度
P=T	P	0	0
P>1/2T	P-M	2M	0
P=1/2T	0	2P	0
P<1/2T	0	2P	M-P
P=0	0	0	M

1. 当P=T时：

$$A = A_1 = \frac{C \cdot P \times 50.05}{V} \times 1000 \quad (2)$$

式中：A——水样的总碱度，CaCO<sub>3</sub>mg/L；

A<sub>1</sub>——氢氧化物碱度，CaCO<sub>3</sub>mg/L；

V——测定时所取水样体积，ml；

C——盐酸标准滴定溶液浓度，mol/L；

50.05——碳酸钙（1/2 CaCO<sub>3</sub>）摩尔质量，g/mol。

2. 当P>1/2T时：

$$A = \frac{C \cdot (P + M) \times 50.05}{V} \times 1000 \quad (3)$$

$$A_1 = \frac{C \cdot (P - M) \times 50.05}{V} \times 1000 \quad (4)$$

$$A_2 = \frac{2C \cdot M \times 50.05}{V} \times 1000 \quad (5)$$

$$C_1(1/2CO_3^{2-}) = \frac{2C \cdot M}{V} \times 1000 \quad (6)$$

式中：A<sub>2</sub>——碳酸盐碱度，CaCO<sub>3</sub>mg/L；

C<sub>1</sub>——碳酸盐浓度，mmol/L。

3. 当P=1/2T时：



$$A = A_2 = \frac{2C \cdot P \times 50.05}{V} \times 1000 \quad (7)$$

$$C_1(1/2\text{CO}_3^{2-}) = \frac{2C \cdot P}{V} \times 1000 \quad (8)$$

4. 当 $P < 1/2T$ 时:

$$A = \frac{C \cdot (P + M) \times 50.05}{V} \times 1000 \quad (9)$$

$$A_2 = \frac{2C \cdot P \times 50.05}{V} \times 1000 \quad (10)$$

$$C_1(1/2\text{CO}_3^{2-}) = \frac{2C \cdot P}{V} \times 1000 \quad (11)$$

$$A_3 = \frac{C \cdot (M - P) \times 50.05}{V} \times 1000 \quad (12)$$

$$C_2(\text{HCO}_3^-) = \frac{C \cdot (M - P)}{V} \times 1000 \quad (13)$$

式中:  $A_3$ ——重碳酸盐碱度,  $\text{CaCO}_3\text{mg/L}$ ;

$C_2$ ——重碳酸盐浓度,  $\text{mmol/L}$ 。

5. 当 $P=0$ 时:

$$A = A_3 = \frac{C \cdot M \times 50.05}{V} \times 1000 \quad (14)$$

$$C_2(\text{HCO}_3^-) = \frac{C \cdot M}{V} \times 1000 \quad (15)$$

## 八、注意事项

1. 本方法适用一般非浑浊、低色度地面水。对于重碳酸盐和碳酸盐的计算,只适用于仅含有氢氧化物、重碳酸盐和碳酸盐组成碱度的水样。

2. 干扰及消除

水样浑浊、有色均干扰测定,应用电位滴定法测定。能使指示剂褪色的氧化物也干扰测定。如水样中余氯破坏指示剂,应加入1~2滴0.1mol/L硫代硫酸钠消除。

3. 配制溶液用的除 $\text{CO}_2$ 纯水是用纯水经煮沸驱除 $\text{CO}_2$ 后冷却制得的。

4. 水样中 $\text{OH}^-$ 、 $\text{HCO}_3^-$ 不能共存。

5. 作为总碱度单位的 $\text{mmol/L}$ ,均以折算为单位电荷的离子量作为基本单元(如 $\text{HCO}_3^-$ 、 $1/2\text{CO}_3^{2-}$ 、 $\text{OH}^-$ 等),碱度的单位也可用德国度。

6. 海水一般只测定总碱度。

## 实验五 水中硝酸盐氮含量的测定

### 一、水中亚硝酸盐氮含量的测定

#### (一) 实验目的

掌握用萘乙二胺分光光度法测定亚硝酸盐氮的原理和操作技术。

#### (二) 实验要求

掌握用重氮——偶氮比色法测定亚硝酸盐氮的方法及实验技术。

#### (三) 原理

在酸性介质中亚硝酸盐与磺胺进行重氮化反应，其产物再与盐酸萘乙二胺偶合生成深红色偶氮染料，于 543nm 波长测定吸光值。

#### (四) 仪器

1. 移液管
2. 容量瓶
3. 分光光度计
4. 常规实验室设备

#### (五) 试剂及其配制

1. 盐酸溶液 (1:6): 取盐酸 1 体积加 6 体积的蒸馏水，混匀。
2. 磺胺溶液 (10g/L): 称取 5g 磺胺 ( $C_6H_8O_2N_2S$ )，溶于 350ml 盐酸溶液 (1: 6)，用蒸馏水稀释至 500ml，盛于棕色试剂瓶中，有效期为 2 个月。
3. 盐酸萘乙二胺溶液 (1g/L): 称取 0.5g 盐酸萘乙二胺 ( $C_{12}H_{14}N_2 \cdot 2HCl$ )，溶于 500ml 蒸馏水中，盛于棕色试剂瓶中于冰箱内保存，有效期为半个月。
4. 亚硝酸钠标准贮备溶液 (10.0 $\mu$ mol (N) /ml): 称取 0.6900g 亚硝酸钠 (AR，于 115 $^{\circ}$ C 烘 1h)，溶于少量水中后全量转移入 1000ml 容量瓶中，加水至标线，混匀。加 2ml 三氯甲烷 ( $CHCl_3$ )，混匀。贮于棕色试剂瓶中于冰箱内保存，有效期为两个月。
5. 亚硝酸钠标准使用溶液 (0.10 $\mu$ mol (N) /ml): 取 1.00ml 标准贮备液于 100ml 容量瓶中，用蒸馏水稀释至标线，混匀。临用前配制。

#### (六) 测定步骤

##### 1. 绘制标准曲线

- ① 取 6 个 100ml 锥形瓶 (清洁、干燥)，分别加入 0、0.50、1.00、1.50、2.00、2.50ml 亚硝酸钠标准使用溶液，并分别加水至 50ml，混匀。
- ② 每个锥形瓶中各加入 1.0ml 磺胺溶液，混匀。
- ③ 在每个锥形瓶中各加入 1.0ml 盐酸萘乙二胺溶液，混匀，放置显色 15min。
- ④ 用分光光度计在 543nm 波长，20mm 比色皿，以蒸馏水作参比，测上述各溶液的吸光值  $A_i$ 。其中未加标准使用液的做为试剂空白，吸光值为  $A_0$ 。
- ⑤ 在坐标纸上，以吸光值 ( $A_i - A_0$ ) 为纵坐标，亚硝酸盐氮浓度为横坐标绘制标准曲线。

序列号	1	2	3	4	5	6
亚硝酸钠标准使用液体积 (ml)	0	0.50	1.00	1.50	2.00	2.50
亚硝酸盐氮浓度 ( $\mu$ mol (N) /L)	0	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00

## 2. 水样的测定

- ① 移取 50.0ml 已过滤的水样于 100ml 锥形瓶中。(取双样)
- ② 参照标准曲线制定过程中的步骤②—④, 显色并测定该水样的吸光值  $A_w$ 。
- ③ 量取 50.0ml 澄清水样 (如水样较浑浊需经过滤), 参照上述步骤④, 测量由于水样浑浊引起的吸光值  $A_t$ 。

### (七) 结果计算

水样由亚硝酸盐氮引起的吸光值可依下式计算:  $A_n = A_w - (A_t + A_0)$ , 由  $A_n$  查标准曲线, 得该水样中亚硝酸盐氮的浓度。

### (八) 注意事项:

1. 水样可用有机玻璃或塑料采水器采集, 经  $0.45\mu\text{m}$  滤膜过滤后贮于聚乙烯瓶中, 应从速分析, 必须在 12h 内测定完毕; 水样加盐酸萘乙二胺后, 须在 2h 内测量完毕, 并避免阳光照射。
2. 水样需过滤时, 滤纸中常含有不可忽略的亚硝酸根, 水样过滤后时结果偏高。使用前应用纯水淋洗滤纸, 并检查有无  $\text{NO}_2^-$ , 若有则应淋洗到无  $\text{NO}_2^-$  后才开始过滤水样。
3. 本法的显色速度与显色过程与水的温度有关, 若水温太低 (低于  $10^\circ\text{C}$ ), 可在水浴中温热 (不得高于  $30^\circ\text{C}$ ) 反应。要注意各管受热一致, 温度相同时, 颜色稳定后可保持十多个小时不变。
4. 标准曲线每隔一周须重制一次, 当测定样品的实验条件与制定标准曲线的条件相差较大时, 如更换光源或光电管、温度变化较大时, 须及时重制标准曲线。
5. 无氮海水可模仿人工海水配方以化学试剂配制, 也可取低氮澄清水, 放入海藻置于阳光下照射数日除氮。

## 二、水中硝酸盐氮含量测定

### (一) 实验目的

掌握水中硝酸盐氮含量测定的实验方法和分析技术。

### (二) 实验要求

掌握用锌镉还原——重氮偶氮法测定硝酸盐氮的实验原理及方法。

### (三) 原理

在一定盐度条件下, 加锌卷和氯化镉溶液于水样中, 其中的硝酸盐被还原为亚硝酸盐, 然后按重氮—偶氮法测出亚硝酸盐氮的总含量, 扣除水样中原有的亚硝酸盐氮含量即得硝酸盐氮的含量。

### (四) 仪器及设备

1. 分光光度计及配套比色皿
2. 具塞比色管
3. 容量瓶、移液管等常规实验室设备

### (五) 试剂及其配制

1. 磺胺溶液：同亚硝酸盐氮的测定。
2. 盐酸萘乙二胺溶液：同亚硝酸盐氮的测定。
3. 氯化镉溶液（20%）：称取 20g 氯化镉（ $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ ）溶于蒸馏水中，并稀释至 100ml，盛于滴瓶中。
4. 锌卷：将锌片（AR）截成 5cm×6cm 的锌片，用 1.5cm 外径的试管卷成 5cm 高的锌卷，置于具盖的 1000ml 广口瓶中。
5. 氯化钠溶液（20%）：取 20g 氯化钠，加蒸馏水至 100ml 溶解，混匀。
6. 硝酸钾标准贮备液（10.0 $\mu\text{mol}$ （N）/ml）：称取  $\text{KNO}_3$ （AR，于 115℃ 烘 1h）1.011g，溶于蒸馏水中，并于 1000ml 容量瓶中定容，加 1ml 氯仿并避光保存。
7. 硝酸钾标准使用液（0.10 $\mu\text{mol}$ （N）/ml）：移取 1.00ml 标准贮备液于 100ml 容量瓶中用蒸馏水定容、混匀，临使用前配制。

### (六) 测定步骤

#### 1. 绘制工作曲线

- ① 在 6 个 60ml 广口试剂瓶（清洁、干燥的）中分别移入硝酸钾标准使用液 0、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00ml，并分别加蒸馏水至 50ml（若是淡水样品，再分别加入 5ml 20% 的 NaCl 溶液，混匀）。
- ② 分别用镊子夹入锌卷 1 卷，氯化镉溶液 2 滴，加上瓶盖，顺序放入振荡器振荡 10min。
- ③ 将广口试剂瓶中的溶液顺序倒入 6 个 100ml 锥形瓶（清洁、干燥的）中，分别加入磺胺溶液 1ml，混匀。
- ④ 分别加入盐酸萘乙二胺溶液 1ml，混匀，放置 15min。
- ⑤ 用分光光度计在 543nm 波长处于 20mm 比色皿对照纯水测定上述各溶液的吸光度  $A_i$ （其中未加标准使用液为试剂空白，吸光度为  $A_0$ ）。
- ⑥ 在坐标纸上，以吸光度  $A_i - A_0$  为纵坐标，硝酸盐氮浓度为横坐标作图，得工作曲线。

序列号	1	2	3	4	5	6
硝酸钾标准使用液体积（ml）	0.00	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00
硝酸盐氮浓度（ $\mu\text{mol}$ （N）/L）	0.00	2.00	4.00	6.00	8.00	10.00
吸光度值（ $A_i - A_0$ ）	0					

#### 2. 水样测定（取双样）

- （1）量取 50ml 过滤水样，置于 60ml 广口试剂瓶中（若是淡水水样，再分别加入 5ml 20% 的 NaCl 溶液），混匀。
- （2）参照工作曲线绘制过程中步骤②—⑤，还原、显色并测定该水样的吸光值  $A_w$ 。
- （3）另取 50ml 澄清水样，置于 100ml 锥形瓶中（若是淡水水样，再分别加入 5ml 20% 的 NaCl 溶液），混匀。参照工作曲线绘制过程中步骤③—⑤，显色并测定其吸光度（该吸

光度为水样原有的亚硝酸盐引起的吸光度  $A_{\text{NO}_2^-}$ 、浑浊引起的吸光度  $A_t$  和试剂空白吸光度  $A_0$  之和，即  $A_{\text{NO}_2^-} + A_t + A_0$  )。

#### (七) 结果计算

水样由硝酸盐氮引起的吸光度可依下式计算：

$$A_n = A_w - (A_{\text{NO}_2^-} + A_t + A_0)$$

由  $A_n$  查相应温度下制定的工作曲线，得该水样的硝酸盐氮浓度。

#### 八、注意事项

若水样是海水样品，则在工作曲线制定过程中，应以无氮海水代替纯水配制标准系列；而海水中因含有大量的  $\text{NaCl}$  等强电解质，所以在还原前不必再外加  $\text{NaCl}$  溶液。

## 实验六 水中活性磷含量的测定

### 一、实验目的

掌握水中活性磷含量测定的实验方法和分析技术。

### 二、实验要求

掌握用钼蓝比色法测定水中活性磷含量的方法和技术。

### 三、方法原理

水样中的活性磷酸盐采用磷钼蓝法测定。活性磷酸盐在一定的酸性条件下可与钼酸铵作用，生成淡黄色的磷钼黄，但磷钼黄发色能力弱，在通常的磷浓度下显不出黄色来。磷钼黄可被还原剂（氯化亚锡、抗坏血酸、亚硫酸钠等）还原成发色能力很强的蓝色化合物——“磷钼蓝”，还原后的溶液在 690nm 处有较大吸收，可用比色法分析。

### 四、仪器及设备

1. 分光光度计及配套比色皿
2. 具塞比色管
3. 容量瓶、移液管等常规实验室设备

### 五、试剂及其配制

1. 钼酸铵溶液（10%）：称取 5g 钼酸铵固体 $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ ，溶解后稀释至 50ml，若溶液浑浊应取其澄清液贮于聚乙烯瓶中。
2. 硫酸溶液（1:1）：在不断搅拌下将浓硫酸缓缓倒入同体积蒸馏水中，冷却后盛于试剂瓶中。
3. 钼酸铵—硫酸混合试剂：1 体积钼酸铵溶液与 3 体积硫酸溶液混合，混匀后贮于聚乙烯瓶中，此溶液避光保存可稳定数日，如发现混浊或变蓝须重新配制。
4.  $\text{SnCl}_2$  甘油溶液（2.5%）：称取二氯化锡固体（ $\text{SnCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）溶于 100ml 甘油中，温热搅拌促其溶解，此溶液贮于棕色试剂瓶中。此溶液可稳定数日。
5. 磷标准贮备液（ $10.0\mu\text{mol}(\text{P})/\text{ml}$ ）：称取  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ （AR，于  $115^\circ\text{C}$  下烘 1h）1.361g 溶于蒸馏水中，并转入 1000ml 容量瓶中定容，混合后加入 2ml 氯仿避光保存。
6. 磷标准使用液（ $0.100\mu\text{mol}(\text{P})/\text{ml}$ ）：移取 1.0ml 标准贮备液于 100ml 容量瓶中定容，前临时配制。

### 六、测定步骤

#### 1. 绘制工作曲线

① 在 6 个清洁、干燥的 250ml 锥形瓶中，分别加入 0、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00ml 磷标准使用液，并分别以纯水稀释至 100ml，混匀。

② 分别加入钼酸铵—硫酸混合试剂 2ml，混匀后放置 3min；再分别加入 2.5% $\text{SnCl}_2$  甘油溶液 4 滴，混匀后显色 10min。

③ 用分光光度计在 690nm 波长处，于 30mm 比色皿中对照蒸馏水测定上述溶液的吸光度  $A_i$  值（其中试剂空白吸光度为  $A_0$ ）。

④ 在坐标纸上，以吸光度  $A_i-A_0$  为纵坐标，磷浓度为横坐标作图，得工作曲线。

序列号	1	2	3	4	5	6
磷标准使用液体积 (ml)	0	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00
磷浓度 ( $\mu\text{mol (P) /L}$ )	0	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00
吸光度 $A_i-A_0$	0					

## 2. 水样的测定（双样测定）

① 取 100ml 澄清水样于 250ml 锥形瓶中。

② 参照标准曲线绘制过程中的步骤②、③，显色并测定该水样的吸光度值  $A_w$ 。

③ 另取澄清水样 100ml，加入 1.5ml 硫酸溶液（1:1）后混匀，参照标准曲线绘制过程中的步骤③测定由于水样浑浊引起的吸光度值  $A_t$ 。

## 七、结果计算

水样中由活性磷酸盐引起的吸光度  $A_p=A_w-(A_t+A_0)$ ，由  $A_p$  在工作曲线上查得该水样中活性磷酸盐的含量。

## 八、注意事项

1. 显色后须在 30min 之内测定溶液的吸光度值，30min 之后溶液的颜色将逐渐减退。

2. 水样的含盐量对磷钼蓝的显色有影响。对于海水样品，上述从工作曲线上查得的数值尚需乘以适当的校正系数  $K_s$ ，才能获得海水样品中活性磷酸盐磷的实际浓度。

3. 由于磷钼蓝的摩尔吸光系数较小，比色时采用液层厚度较大的比色皿可提高测定的精确度。

## 实验七 水中化学耗氧量的测定

### 一、实验目的

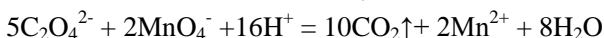
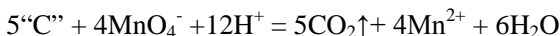
掌握水中化学耗氧量测定的实验方法和分析技术。

### 二、实验要求

掌握酸性高锰酸钾法测定化学需氧量的原理、步骤、数据处理、注意事项与结果的讨论等。

### 三、方法原理

在酸性条件下，加入一定量的高锰酸钾溶液氧化水样中的还原性物质（主要是有机物），过量的高锰酸钾采用标准草酸溶液还原，反应如下：



### 四、仪器及设备

移液管、滴定管、加热板等常规实验室设备

### 五、试剂及其配制

1. 草酸溶液（ $\text{C}1/2\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 = 0.01000\text{mol/L}$ ）：称取 0.6325g 草酸（ $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , AR），溶于适量蒸馏水后，全部转入 1000ml 容量瓶，并稀释至刻度。

2. 高锰酸钾标准溶液（ $\text{C}1/5\text{KMnO}_4 = 0.01\text{mol/L}$ ）：称取 3.5g 高锰酸钾，溶于 1000ml 蒸馏水中，煮沸 10—15min，放置 7—10 天，玻璃棉过滤，再用煮沸并冷却过的蒸馏水稀释 10 倍，储存于棕色玻璃瓶中，避光保存。

2. 硫酸溶液（1：3）：取 50ml 化学纯浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$  倾入 150ml 蒸馏水中，并用玻璃不断搅拌，趁热滴入  $\text{KMnO}_4$  溶液直至呈稳定的微红色为止。

### 六、测定步骤

#### 1. 水样测定（双样测定）

（1）水样取样量  $V_{\text{水样}}$  的确定

① 吸取水样  $V_{\text{水样}}$ ，加蒸馏水稀释至约 100ml，加 5ml 硫酸溶液（1：3）及 10.00ml 高锰酸钾标准溶液（0.01mol/L）。

② 加数粒玻璃珠或沸石于锥形瓶中，在瓶口加一小漏斗，并用大火均匀地将瓶内溶液加热至沸，从开始冒大气泡（沸腾）算起准确煮沸 10min，立即取下锥形瓶。此时溶液应为淡红色，若溶液的红色消失，表明所取水样中有机物含量过多，应重新减少取样量，直至加热后溶液可保持淡红色为止。

（2）立即在锥形瓶中 10.00ml 草酸溶液（0.01000mol/L），摇匀。

（3）趁热立即用高锰酸钾溶液（0.01mol/L）滴定至溶液成微红色 0.5min 内不退为止，记录高锰酸钾消耗量  $V$ 。

#### 2. 高锰酸钾溶液浓度的标定（双样测定）

在滴定后的溶液中，趁热加入 10.00ml 草酸溶液（0.01000mol/L），立即用高锰酸钾溶液（0.01mol/L）滴定至微红色 0.5min 内不退为止，记录高锰酸钾消耗量  $V_1$ 。



## 七、结果计算

### 1. 高锰酸钾浓度的计算

$$C_{1/5KMnO_4} = \frac{C_{1/2H_2C_2O_4} \times 10.00}{V_1}$$

### 2. 水样化学耗氧量的计算

$$COD(mg/L) = \frac{[C_{1/5KMnO_4} \times (10.00 + V) - C_{1/2H_2C_2O_4} \times 10.00] \times 8}{V_{\text{水样}}} \times 1000$$

## 八、注意事项

1. 取水样时，应摇匀后吸取。若用稀释水，则应做稀释水的空白滴定，以便从水样中减去稀释水耗用高锰酸钾标准溶液的体积。

2. 水样中含无机还原性物质较多时，应在不加热煮沸情况下，按本法测定这些还原性物质（如亚硝酸盐、亚铁盐、硫化物等）的数量，并将测定值从耗氧量中减去，才是水样中有机物的耗氧量。有文献报道，在含铁量为 0.1—0.2mg/L、亚硝酸根为 0.1mg/L 及硫化物为 0.1—0.2mg/L 以下时，可不予考虑。

3. 高锰酸钾溶液的标定往往不单独做，而是在水样测定结束后做。

## 实验八 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%。

## 实验九 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 $\times$ 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 $\times$ 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<sub>i</sub>——试样中各有机氯农药残留量，mg/kg

h<sub>i</sub>——样液中各有机氯农药的峰高，mm

h<sub>is</sub>——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，μg/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，%
α-BHC	0.01	
	0.05	
γ-BHC	0.01	
	0.05	
β-BHC	0.01	
	0.05	
δ-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	

## 实验十 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。



## 实验十一 温度对海洋动物发育速率和孵化率的影响

### 一、实验目的

1. 测定不同温度下海洋动物的发育速率和孵化率，总结某些特定动物发育的生物学零度和热常数。
2. 掌握控温仪、恒温水浴锅、光照培养箱等仪器的使用方法。

### 二、原理

根据有效积温法则，生物胚胎发育所需总热量基本上是一个常数，即  $K = N(T - C)$ ，其中  $K$  为热常数，即完成某一发育阶段所需的总热量， $N$  为完成某一发育阶段所需的时间， $T$  为发育期的平均温度， $C$  为生物学零度。因此，在适温范围内，提高温度可缩小胚胎发育时间。

### 三、仪器与设备

1. 光照培养箱
2. 控温仪或恒温水浴锅
3. 充气机
4. 1000ml 烧杯等玻璃仪器

### 四、实验材料

卤虫 (*Artemia* spp.) 又名丰年虫、丰年虾等，广泛分布于世界各大陆的盐湖、盐田等高盐水域，其适宜盐度范围为 20~100，适宜温度范围为 25℃~30℃。卤虫休眠卵（自天然水域捞取后经分离、干燥后制成商品）孵化的无节幼体是水产动物培养初期的优良饵料，其成体亦可作为水产动物的饵料。正常卤虫休眠卵在适宜条件下，一般 15h 左右开始孵化，24h 孵化率达 90% 以上。

### 五、实验步骤

1. 在 12 只盛有天然过滤海水的 1000ml 烧杯中加入一定数量（如 500 粒）卤虫休眠卵，以小型充气机适量充气，使休眠卵均匀悬浮在海水中，并供以连续光照，强度约 1000Lx。将烧杯分为 4 组，分别在 15℃、20℃、25℃和 30℃（以光照培养箱、控温仪或恒温水浴锅控制水温）温度下孵化。
2. 孵化 15h 后，每隔 1h 对幼体孵化状况进行观察，并在 18、21、24h 分别从 4 个温度组中取 1 样品固定计数，计算孵化率。

温度(℃)	最早孵化时间(h)	18h 孵化率(%)	21h 孵化率(%)	24h 孵化率(%)
15				
20				
25				
30				

3. 以孵化率达 90% 时的孵化时间作为卤虫胚胎发育的所需时间，根据有效积温法则，计算卤虫发育的生物学零度和热常数。

## 实验十二 温度对海洋动物呼吸速率的影响

### 一、实验目的

1. 测定海洋动物在适温范围内呼吸速率，分析与温度的相互关系。
2. 学会温克碘量法测定海水溶解氧含量。

### 二、原理

海洋动物的新陈代谢速率直接受温度的影响，在适宜温度范围内，当温度升高时，新陈代谢速率随之加快，呼吸率（耗氧率）也相应增加。温度与生物代谢速率的关系可用公式  $Q_{10} = [r_2 / r_1]^{10/(t_2 - t_1)}$  描述。式中  $Q_{10}$  表示温度每升高  $10^\circ\text{C}$  时代谢速率的变化， $r_1$  和  $r_2$  分别表示温度在  $t_1$  和  $t_2$  时的耗氧率。

### 三、仪器及设备

1. 自动滴定管
2. 磁力加热搅拌器
3. 控温仪或恒温水浴锅
4. 恒温培养箱
5. 容量瓶等玻璃仪器

### 四、药品与试剂

$\text{MnCl}_2$ 、 $\text{KI}$ 、 $\text{NaOH}$ 、 $\text{H}_2\text{SO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、 $\text{KIO}_3$ 、淀粉等

### 五、实验材料

花蛤、对虾等

### 六、实验步骤

本实验拟在 2 个温度组下进行，每一温度组又分试验组和空白对照组，共 4 组，每组含样品 3 个，分别为起始、培育 1 小时和培养 2h（见下表），简要步骤如下：

1. 取容量 1L 试剂瓶 12 只，用取自实验动物栖息水域的过滤海水（预先充气使含氧量接近饱和）注满，在 2 个试验组水瓶中放入个体大小相近、健康状况良好的对虾 1~2 只（起始样除外），用橡皮塞小心密封（注意不能出现水泡）。分不同温度组在光照培育箱和恒温水浴锅中恒温培养，并给以适宜光照。

2. 每组分别在起始、1h 和 2h 时以温克碘量法（方法参照《海洋监测规范》）测定水中溶解氧的含量，填入下表。测量完成后将瓶中对虾取出，蒸馏水冲洗后用滤纸吸干体表水分称重。

数值 \ 时间 温度	起始	1h	2h
20°C 试验组			
20°C 对照组			
30°C 试验组			
30°C 对照组			

3. 数据计算：各温度组实验前后的溶解氧之差扣除空白对照组氧消耗量后所得值即为该段时间内实验动物的耗氧量，各瓶的耗氧量与瓶中实验动物体重之商则为单位体重耗氧率。将所得数据代入上述公式，计算  $Q_{10}$ 。

### 七、思考题

试分析实验中可能出现的影响因素。

## 附：《海洋监测规范》GB 17378.4-1998 中水中溶解氧的测定（碘量法）

### 1 适用范围和应用领域

本法适用于大洋和近岸海水及河水、河口水溶解氧的测定。

### 2 方法原理

水样中溶解氧与氯化锰和氢氧化钠反应，生成高价锰棕色沉淀。加酸溶解后，在碘离子存在下即释出与溶解氧含量相当的游离碘，然后用硫代硫酸钠标准溶液滴定游离碘，换算溶解氧含量。

### 3 试剂及其配制

除另有说明，所用试剂均为分析纯，水为蒸馏水或等效纯水。

#### 3.1 氯化锰溶液：

称取 210g 氯化锰( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )，溶于水，并稀释至 500ml。

#### 3.2 碱性碘化钾溶液：

称取 250g 氢氧化钠( $\text{NaOH}$ )，在搅拌下溶于 250ml 水中，冷却后，加 75g 碘化钾( $\text{KI}$ )，稀释至 500ml，盛于具橡皮塞的棕色试剂瓶中。

#### 3.3 硫酸溶液：1+1。

在搅拌下，将 50ml 浓硫酸( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ， $\rho=1.84\text{g/ml}$ )小心地加到同体积的水中，混匀。盛于试剂瓶中。

#### 3.4 碘酸钾标准溶液： $c(1/6\text{KIO}_3)=0.0100\text{mol/L}$

称取 3.567g 碘酸钾： $(\text{KIO}_3)$ ，优级纯，预先在  $120^\circ\text{C}$  烘 2h，置于硅胶干燥器中冷却，溶于水中，全量移入 1000ml 量瓶中，加水至标线，混匀。置于冷暗处，有效期为一个月。使用时量取 10.00ml 加水稀释至 100ml，此液浓度为  $0.0100\text{mol/L}$ 。

#### 3.5 碘化钾( $\text{KI}$ ，化学纯，干燥)。

#### 3.6 高锰酸钾溶液： $c(1/5\text{KMnO}_4)=0.01\text{mol/L}$ 。

称取 0.32g 高锰酸钾( $\text{KMnO}_4$ )，溶于 20ml 水中，加热煮沸 10min，冷却，移入棕色试剂瓶中，稀释至 1L，混匀。放置 7d 左右，用玻璃砂芯漏斗过滤。

#### 3.7 硫酸溶液：1+3。

在搅拌下，将 1 体积浓硫酸( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ， $\rho=1.84\text{g/ml}$ )慢慢加入 3 体积水中，趁热滴加高锰酸钾溶液( $0.01\text{mol/L}$ )，至溶液略呈微红色不褪为止，盛于试剂瓶中。

#### 3.7 淀粉溶液：5g/L。

称取 1g 可溶性淀粉，用少量水搅成糊状，加入 100ml 煮沸的水，混匀，继续煮至透明。冷却后加入 1ml 乙酸，稀释至 200ml，盛于试剂瓶中。

#### 3.8 硫代硫酸钠标准溶液： $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O})=0.01\text{mol/L}$

称取 2.5g 硫代硫酸钠( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )，用刚煮沸冷却的水溶解，加入约 0.2g 碳酸钠，移入棕色试剂瓶中，稀释至 1L，混匀。置于阴凉处。

浓度的标定：

移取 10.00ml 碘酸钾标准溶液( $0.0100\text{mol/L}$ )，沿壁流入碘量瓶中，用少量水冲洗瓶壁，加入 0.5g 碘化钾，沿壁注入 1.0ml 硫酸溶液(1+3)，塞好瓶塞，轻荡混匀，加少许水封口，在暗处放置 2min。轻轻旋开瓶塞，沿壁加入 50ml 水，在不断振摇下，用硫代硫酸钠溶液( $0.01\text{mol/L}$ )滴定至溶液呈淡黄色，加入 1ml 淀粉溶液( $5\text{g/L}$ )，继续滴定至溶液蓝色刚褪去为止。重复标定，至两次滴定读数差小于  $0.05\text{ml}$  为止。按式(1)计算其浓度：

$$c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = \frac{10.00 \times 0.0100}{V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}} \quad (1)$$

式中： $c_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$ ——硫代硫酸钠标准溶液浓度，mol/L；

$V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$ ——硫代硫酸钠标准溶液体积，ml。

#### 4 仪器及设备

——水样瓶：容积 125ml 左右，瓶塞为锥形，磨口要严密，容积须经校正；

——玻璃管：直径 5~6mm，长 12cm；

——乳胶管：直径同玻璃管，长 20~30cm；

——溶解氧滴定管：25ml，分刻度 0.05ml；

——电磁搅拌器：转速可调至 150~400r/min；

——玻璃磁转子：直径约 3~5mm，长 25mm；

——锥形烧瓶：250ml；

——碘量瓶：250ml；

——量筒：100ml；

——烧杯：500，1000ml；

——试剂瓶：500ml，棕色；

——移液吸管：5ml、20ml；

——一般实验室常备仪器和设备。

#### 5 分析步骤

##### 5.1 水样的固定

打开水样瓶塞，立即用定量加液器(管尖插入液面)依序注入 1.0ml 氯化锰溶液和 1.0ml 碱性碘化钾溶液，塞紧瓶塞(瓶内不准有气泡)，按住瓶盖将瓶上下颠倒不少于 20 次。

##### 5.2 测定步骤

5.2.1 样品固定后约 1h 或沉淀完全后打开瓶塞(若在水样瓶中全量滴定，则勿摇动沉淀，小心地虹吸出上部澄清液)，立即用定量加液器注入 1.0ml 硫酸溶液(1+1)。

5.2.2 塞好瓶塞，反复颠倒样品瓶至沉淀全部溶解。

5.2.3 静置 5min，小心打开溶解氧瓶塞，量取 100ml(或适量)经上述处理后的水样，移入锥形瓶中(若全量滴定，可不移入锥形瓶)，并顺瓶壁轻轻放入一个玻璃磁转子，将锥形瓶置于滴定台上。

5.2.4 将已标定的硫代硫酸钠溶液(0.01mol/L)注满溶解氧滴定管，开动电磁搅拌器，进行滴定。

5.2.5 待溶液呈淡黄色时，加 1ml 淀粉溶液(5g/L)，继续滴定至蓝色刚刚退去。

5.2.6 将滴定管读数记于溶解氧分析记录附表中。

#### 6 记录和计算

a) 水样中溶解氧浓度(见式 2)：

$$\rho_{\text{O}_2} = \frac{c \times V \times f_1 \times 8}{V_1} \times 1000 \quad (2)$$

式中： $\rho_{\text{O}_2}$ ——水样中溶解氧浓度，mg/L；

$V$ ——滴定样品时用去硫代硫酸钠溶液体积, ml;

$c$ ——硫代硫酸钠溶液的浓度, mol/L;

$V_1$ ——滴定用全部或部分固定水样的体积, ml;

$f_1 = \frac{V_2}{V_2 - 2}$ , 其中  $V_2$ ——固定水样总体积(水样瓶的容积), ml; 2 为氯化锰溶

液和碱性碘化钾溶液的体积, ml;

b)饱和度的计算

氧的饱和度(%)= $O_2/O_2' \times 100$

式中:  $O_2$ ——测得的含氧量, mg/L;

$O_2'$ ——现场的水温及氯度条件下, 样品中氧的饱和含量, mg/L。

## 7 注意事项

7.1 滴定临近终点, 速度不宜太慢, 否则终点变色不敏锐。如终点前溶液显紫红色, 表示淀粉溶液变质, 应重新配制。

7.2 水样中含有氧化性物质可以析出碘产生正干扰, 含有还原性物质消耗碘产生负干扰。

## 实验十三 群落多样性的测定

### 一、实验目的

1. 通过对教学实习采样标本（底栖生物或浮游生物）的鉴定，分析群落物种多样性。
2. 掌握物种多样性指数的计算方法。

### 二、原理

某一群落的物种多样性指群落中现存物种的数目（即物种的丰度）和物种的相对多度（即均匀度）。生态学上常用辛普森多样性指数及香农—威弗指数来表示物种多样性。

辛普森多样性指数： $D = 1 - \sum_{i=1}^S (P_i)^2$       s: 物种数       $P_i$ : 第 i 种个体数

香农—威弗指数： $H' = -\sum_{i=1}^S P_i \log_2 P_i$       s: 物种数       $P_i$ : 第 i 种个体数

### 三、仪器与设备

1. 显微镜
2. 解剖镜
3. 采水瓶
4. 取样框
5. 铲子
6. 镊子

### 四、药品与试剂

甲醛、路戈氏碘液等

### 五、实验步骤

#### 1. 取样

(1) 浮游植物取样：用采水瓶分别于正常海区和污染海区采取一定水层、一定体积的水样，加甲醛或路戈氏碘液固定后于相应体积的量筒中沉淀浓缩。

(2) 底栖生物取样（以滩涂生物为例）：选择有代表性的区域，以 25cm×25cm 或 50cm×50cm 取样框对高、中、低潮区的生物群落覆盖取样。

#### 2. 种类鉴定和计数

浮游植物样品是将浓缩后的水样混匀后，用浮游植物计数框于显微镜下进行种类鉴定（ $i = 1 \sim s$ ）并计数每个种类的数量（ $P_i \sim P_s$ ）。附着生物样品可直接在现场于取样框中确定种类数和各种的个体数，不能在现场鉴定的种类可用铲子或镊子取下后带回实验室鉴定。

#### 3. 数据计算和分析

将所得物种数和物种个体数分别代入上述公式，计算物种多样性指数。并根据生态学原理试析不同海区浮游植物群落或岩石相高、中、低潮区生物群落物种多样性程度差异的原因。