

文章编号: 1674-5566(2012)03-0358-05

氨氮对斑节对虾的毒性及免疫指标的影响

李永^{1,2}, 杨其彬¹, 苏天凤¹, 周发林¹, 杨丽诗¹, 黄建华¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300; 2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 采用生物毒性实验方法研究了氨氮对斑节对虾的急性毒性作用, 结果表明: 毒性效应与氨氮浓度和中毒时间呈正相关, 在海水温度为 30 ℃, pH 为 8, 盐度为 34.5 条件下, 氨氮对斑节对虾 24 h、48 h、72 h、96 h 的半致死浓度分别为 52.63 mg/L、39.68 mg/L、31.65 mg/L、29.94 mg/L, 安全浓度为 2.99 mg/L, 对应的非离子氨分别为 3.23 mg/L、2.43 mg/L、1.94 mg/L、1.84 mg/L, 安全浓度为 0.18 mg/L。并在浓度为 29.94 mg/L 氨氮胁迫下, 对斑节对虾免疫指标的影响进行了研究。结果显示, 在 96 h 内斑节对虾血清中免疫指标变化为: 酚氧化酶(PO)的活力总体上呈下降趋势; 超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)活力变化均是先升高, 再下降; 酸性磷酸酶(ACP)的活力变化为先升高, 然后下降, 再上升。单因素方差分析(ANOVA)表明, 斑节对虾血清中的 PO、SOD、POD、ACP 活力 8 个取样时间点(0 h、4 h、8 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h)内均有极显著性差异($P < 0.01$)。而对对照组 8 个取样时间点的各酶活力均未达到显著差异($P > 0.05$)。本研究获得了氨氮对斑节对虾的急性毒性结果和在高氨氮胁迫下免疫因子的变化规律, 发现高氨氮对斑节对虾免疫系统有重要影响, 为斑节对虾养殖健康发展提供科学依据。

研究亮点: 研究获得了高盐条件下氨氮对斑节对虾的急性毒性效应及所引发血清免疫指标变化规律, 发现氨氮胁迫对斑节对虾免疫系统有重要影响, 补充了相关研究的基础数据, 为斑节对虾养殖健康发展和耐氨氮能力测试与评价提供科学依据。

关键词: 斑节对虾; 氨氮; 免疫指标

中图分类号: S 917

文献标志码: A

氨氮是水产养殖环境中的一种重要环境污染因子。研究表明, 高浓度氨氮胁迫对甲壳动物的免疫和肝胰腺有着重要影响, 长时间胁迫导致其免疫力下降, 肝胰腺组织结构受到破坏^[1-4]。甲壳动物体液中不具有免疫球蛋白, 缺乏抗体介导的免疫反应来自自我保护, 其免疫反应以非特异性免疫为主, 由血细胞及从细胞释放到血浆中的多种活性因子来抵抗外物的入侵。在多种体液因子中, 酚氧化酶(PO)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、酸性磷酸酶(ACP)等酶活力高低常被用做衡量对虾免疫活力高低的参照指标^[5-6]。本文研究氨氮对斑节对虾的毒性作用及在高氨氮胁迫下斑节对虾体液中与免疫相关酶 PO、SOD、POD、ACP 活性的变化情况, 旨在讨论氨氮对斑节对虾免疫指标的影响, 为斑节对虾养

殖健康发展提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验在中国水产科学研究院南海水产研究所三亚热带水产研究中心进行, 所用斑节对虾由课题组自行繁育苗种获得, 经一段时间标粗养殖, 挑选体色正常, 体质健壮, 体长为(5.0 ± 0.3) cm 的个体进行实验。

1.2 实验方法

1.2.1 氨氮急性毒性实验

实验设有对照组和实验组, 对照组所用水为经沉淀、消毒的自然海水, 氨氮浓度为 0.04 mg/L, 实验组浓度梯度按等对数间距设置, 分别为 22.63、32.00、45.25、64.00、90.51 mg/L, 氨氮

收稿日期: 2011-12-01 修回日期: 2011-12-19

基金项目: 虾产业技术体系(nycytx-47); 广东省科技计划项目(2009B020308002)

作者简介: 李永(1985—), 男, 硕士研究生, 研究方向为斑节对虾种质资源与遗传育种。E-mail: kftxliyong@163.com

通讯作者: 黄建华, E-mail: hjh210440@sina.com.cn

浓度用氯化铵(分析纯)配制,每 12 h 换实验液一次。每个实验梯度均设置 3 个平行组,每个平行组有 20 尾斑节对虾,实验水体为 200 L,温度为 $(30 \pm 1.5)^\circ\text{C}$, pH 为 8.0 ± 0.5 , 盐度为 34.5 ± 0.5 。实验期间不充气,定时观察个体死亡情况,及时取出死亡个体,准确记录 24、48、72、96 h 的死亡尾数。

实验结束后以直线内插法^[7]求出氨氮对斑节对虾的半致死浓度(LC₅₀),并按公式计算出安全浓度(SC)^[8]。

非离子氨(NH₃)在总氨氮中占的百分数通过以下公式^[9]计算得出

$$NH_3(\%) = \frac{100}{1 + 10^{(pK_{a,S,T} - pH)}} \quad (1)$$

$$pK_{a,S,T} = 9.24 + 0.003091S + 0.0324(298 - T)$$

式中: T 表示绝对温度($T = 273^\circ\text{C} + t$), t 为摄氏温度; S 代表盐度; $pK_{a,S,T}$ 为电离常数。

1.2.2 氨氮对免疫指标影响实验

实验组的氨氮浓度为 29.9 mg/L(通过急性毒性实验获得斑节对虾 96 h 半致死浓度),实验组氨氮浓度用氯化铵(分析纯)来调节。实验设有实验组和对照组,每组 3 个平行组,每个平行放 60 尾虾,实验在 500 L 的玻璃纤维桶中进行,水体为 300 L。实验期间不投饵,并及时清污,每 12 h 换实验液一次,经常观察,及时清理死亡的个体。在实验开始后 0、4、8、12、24、48、72、96 h 取样,每个平行随机取虾 2 尾。用 1 mL 的注射器从头胸甲后部插入心区采血。血液采集后 4℃保存过夜,5 000 r/min 离心 20 min,取上层血清用于免疫指标的测定。免疫酶的测定方法如下:

(1) PO 活力的检测,采用改进的 ASHIDA^[10]方法进行测定,在实验条件下每分钟 OD₄₉₀值增加 0.001 定义为一个酶活力单位。

(2) POD 相对活力的检测,采用改进的雷质文等^[6]方法,POD 相对活力以 $A_{\text{POD}} = (A_2 - A_1) \times \text{稀释倍数}$ 表示。

(3)按照南京建成生物工程研究所的 SOD 测试盒说明书进行操作,每毫升反应液中 SOD 抑制率达 50%时所对应的 SOD 量为一个 SOD 活力单位。

(4)按照南京建成生物工程研究所的 ACP 测试盒说明书进行操作,100 mL 血清在 37℃条

件下与基质作用 30 min 产生 1 mg 酚为 1 个活力单位。

1.3 数据处理

用 SPSS 13.0 对不同时间点 4 种免疫酶的活性进行单因素方差分析(ANOVA)。

2 结果

2.1 氨氮急性毒性实验

氨氮急性毒性实验结果见表 1。结果表明:对照组在 96 h 内无死亡。实验组随氨氮浓度的增加,氨氮对虾的毒性作用增强,斑节对虾的死亡率升高。同一氨氮浓度,随着时间的延长,对斑节对虾的毒性作用增强。对表 1 的数据采用直线内插法求出氨氮对 5 cm 左右斑节对虾的 24、48、72、96 h 的半致死浓度分别为 52.63 mg/L、39.68 mg/L、31.65 mg/L、29.94 mg/L,安全浓度为 2.99 mg/L。将 24 h、48 h、72 h、96 h 的半致死浓度、安全浓度转化为非离子氨的浓度为 3.23 mg/L、2.43 mg/L、1.94 mg/L、1.84 mg/L、0.18 mg/L,见表 2。

表 1 氨氮对斑节对虾急性毒性实验结果

Tab.1 Result of acute toxicity test of ammonia-N on *Penaeus monodon*

氨氮/ (mg/L)	校正死亡率/%			
	24 h	48 h	72 h	96 h
0.04(对照组)	0	0	0	0
22.63	16.67	20.00	36.67	40.00
32.00	26.67	36.67	40.00	51.67
45.25	56.67	75.00	80.00	85.00
64.00	56.67	91.67	100.00	100.00
90.51	85.00	100.00	100.00	100.00

表 2 氨氮对斑节对虾的半致死浓度和安全浓度

Tab.2 The LC₅₀ and SC of ammonia-N on *Penaeus monodon*

时间/h	半致死浓度				安全浓度
	24	48	72	96	96
氨氮/(mg/L)	52.63	39.68	31.65	29.94	2.99
非离子氨/(mg/L)	3.23	2.43	1.94	1.84	0.18

2.2 氨氮对免疫指标影响实验

在高浓度氨氮的胁迫下,在实验时间内斑节对虾血清中免疫指标的变化为:PO 的活力呈下降趋势(在 4 h 略有升高);SOD 的活力先上升,

在 12 h 达到最高值,然后下降,96 h 降到最低值;POD 的活力先上升,在 24 h 达到最高值,然后下降,在 96 h 降到最低值。ACP 活力先上升,24 h 上升到最高值,24 ~ 48 h 下降,然后逐渐上升。氨氮胁迫下血清中的各免疫指标的变化见图 1。单因素方差分析表明,斑节对虾血清中的 PO、SOD、POD、ACP 活力 8 个取样时间点间均有极显著性差异($P < 0.01$)。在实验时间内对照组 8 个取样时间点的各酶活力变化不明显,未达到显著差异($P > 0.05$)。

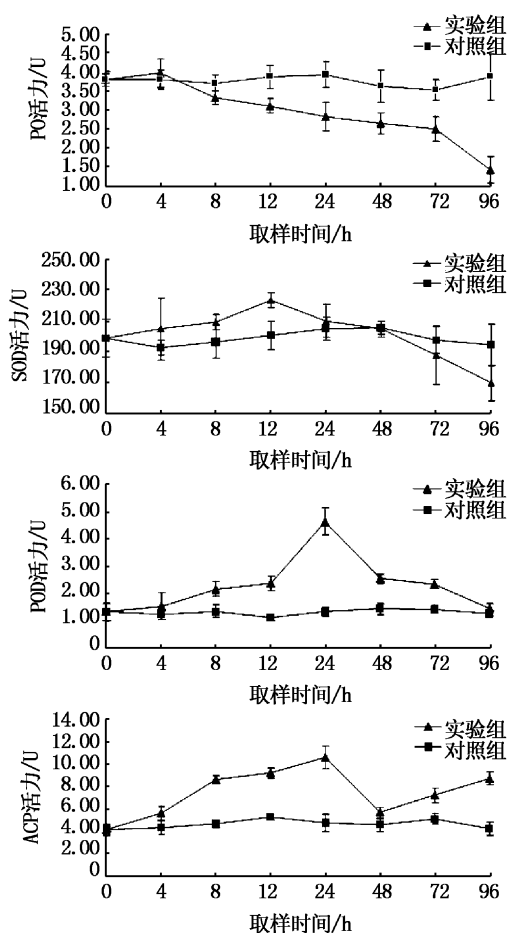


图 1 氨氮对斑节对虾血清中的免疫指标的影响

Fig. 1 Effects of ammonia-N on immune parameters in haemolymph of *Penaeus monodon*

3 讨论

氨氮是水产养殖环境中普遍存在的一种有毒物质,水体中的氨氮主要是以非离子氨(NH_3)和离子氨(NH_4^+)两种形式存在,二者处于动态平衡。由于 NH_3 不带电荷,具有较高的脂溶性,能过穿透细胞膜,对生物造成毒害作用^[11]。从水

体进入组织液内对对虾体内酶的催化作用和细胞产生不良影响。许多研究表明,凡纳滨对虾^[12-13]、日本对虾^[12,14]、罗氏沼虾^[15-16]、克氏原螯虾^[17]等对虾的死亡率都随着氨氮浓度的升高和中毒时间的延长而逐渐增加。这与本实验结果具有一致性。由此得出,毒性效应与氨氮浓度和胁迫时间呈正相关。孙国铭等^[13]研究发现非离子氨对 5 cm 南美白对虾 24 h、48 h、72 h、96 h 的半致死浓度、安全浓度分别为 4.686 mg/L、3.068 mg/L、2.368 mg/L、2.008 mg/L、0.201 mg/L。同本实验结果相比较,可以发现体长同为 5 cm 时,斑节对虾对氨氮的耐受能力低于凡纳滨对虾。

胡贤德等^[18]对不同盐度条件下氨氮对斑节对虾的毒性试验发现,盐度越低,氨氮对斑节对虾的毒性越大,盐度为 25、20、15、10 和 5 的条件下,氨氮的安全浓度分别为 4.4 mg/L、3.2 mg/L、2.2 mg/L、2.1 mg/L、1.3 mg/L。本实验结果表明盐度为 34.5 时,氨氮的安全浓度 2.99 mg/L,低于以上试验中盐度为 25、20 时的安全浓度。这可能与两实验所用虾体长、环境因子不同相关,也可能由于本实验盐度 34.5 超出斑节对虾生长最适盐度范围 20 ~ 30^[19],盐度增加导致氨氮对斑节对虾的毒性增强,还有待进一步研究证实。

酚氧化酶在虾类体液免疫中具有重要的作用。体外物质入侵过程中虾类酚氧化酶原系统被激活,酚氧化酶活化后可以迅速杀死异物。在对虾类的胁迫实验中,血清酚氧化酶活力常被作为虾类的免疫指标之一^[20-23]。超氧化物歧化酶及过氧化物酶都是机体内的抗氧化酶,在清除超氧自由基,氧化自由基,防止生物分子损伤方面发挥重要作用。过多的氧自由基能导致机体免疫力下降,因此机体 SOD 及 POD 活力能反映机体的免疫能力^[24]。在甲壳动物体内的酸性磷酸酶是吞噬溶菌体的重要组成部分,在血细胞进行吞噬和包裹反应中,会伴随有酸性磷酸酶的释放。管晓娟认为 ACP 可以作为判断甲壳动物免疫能力的参考数据^[25]。本实验结果显示,氨氮胁迫对斑节对虾免疫系统有重要影响。

据王玥等^[23]报道,罗氏沼虾在 1 mg/L 非离子氨态氮的胁迫下作用 10 d,PO 活力显著下降。姜令绪等^[26]对氨氮对凡纳滨对虾免疫指标的影响研究发现,随氨氮浓度的升高,48 h 后的 PO 活

力逐渐增大,在氨氮胁迫下,在 48 h 内呈上升趋势。哈承旭等^[22]对氯化铵对“黄海 1 号”中国对虾免疫相关酶类的影响研究显示,在不同浓度的氨氮胁迫 72 h 后,PO 活力均下降,随浓度的升高,PO 活力下降幅度更大。本实验结果显示在 29.9 mg/L 氨氮胁迫下,在 96 h 内 PO 呈下降趋势。以上可以发现,在氨氮的胁迫下,不同的虾类血清中的 PO 活力变化情况不同,作者认为这可能与不同物种耐氨氮能力不同相关。

王专伟等^[27]研究感染白斑综合征病毒的斑节对虾 72 h 内血液免疫酶 SOD、POD 活力变化发现,感染初期活力降低,感染中期活力升高,感染后期活力在降低。本实验与其结果相类似,在胁迫因子的作用下,短期内机体一些免疫相关酶受到刺激会产生应激反应,活力呈上升趋势,然后随着时间的延长活力逐渐降低。但不同的是实验前期 2 种酶的活力变化趋势不同,这可能与不同因子对斑节对虾 SOD、POD 的影响不同有关。

从本实验的变化规律中发现,在斑节对虾受到氨氮胁迫前期,PO、POD、SOD 活力下降之前都有时间不等的上升规律。由于在水体中的氨氮浓度较高时,NH₃ 可以透过细胞膜进入体内,实验前期在低浓度的氨氮作用下,产生“毒物兴奋效应”,即低浓度毒物胁迫下生物免疫力增高现象,通过维持机体的自身平衡来克服胁迫的保护效应。氨氮胁迫中后期,斑节对虾体内氨氮浓度积累增强了毒性效应,机体生理协调失调,PO、POD、SOD 的活力均一直下降。

本实验中 ACP 的变化规律为在应激初期随着时间的延长而 ACP 活力升高,当对虾机体克服胁迫的保护效应达到平衡后,活力呈现出下降趋势,而当斑节对虾体内氨氮浓度积累增强了毒性效应,机体生理协调失调后,又不断通过对虾血细胞进行吞噬和包囊反应释放出来,导致 ACP 活力呈上升趋势。

参考文献:

- [1] 聂月美,邵庆均. 氨氮对虾的免疫影响及其预防措施[J]. 中国饲料, 2006(10): 28-31.
- [2] 黄鹤忠,李义,宋学宏,等. 氨氮胁迫中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)免疫功能的影响[J]. 海洋与湖沼, 2006, 37(3): 198-205.
- [3] 于敏,王顺昌,卢韞,等. 中华绒螯蟹在不同 pH 下氨氮排泄和血淋巴含氮成分的变化[J]. 水生生物学报, 2008, 32(1): 62-65.
- [4] 洪美玲,陈立侨,顾顺樟,等. 氨氮胁迫对中华绒螯蟹免疫指标及肝胰腺组织结构的影响[J]. 中国水产科学, 2007, 14(3): 412-417.
- [5] 罗日祥. 中药制剂对中国对虾免疫活性物质的诱导作用[J]. 海洋与湖沼, 1997, 28(6): 573-578.
- [6] 雷质文,黄健,杨冰,等. 感染白斑综合征病毒(WSSV)对虾相关免疫因子的研究[J]. 中国水产科学, 2001, 8(4): 46-54.
- [7] 郑微云,翁思琪. 环境毒理学概论[M]. 厦门:厦门大学出版社, 1993:57-60.
- [8] ZANG W L. Toxic effects of Cn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} and NH_3 on Chinese prawn [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 1993, 11(3): 95-98.
- [9] 王克行. 虾蟹类增殖学[M]. 北京:中国农业出版社, 1997: 91.
- [10] ASHIDA M. Purification and characterization of pre-phenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori* [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1971, 144(2): 749-762.
- [11] 雷衍之. 养殖水环境化学[M]. 北京:中国农业出版社, 2003: 117-124.
- [12] 姚庆祯,臧维玲,戴习林,等. 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, 2002, 11(1): 21-26.
- [13] 孙国铭,汤建华,仲霞铭. 氨氮和亚硝酸氮对南美白对虾的毒性研究[J]. 水产养殖, 2002, 23(1): 22-24.
- [14] 李建,姜令绪,王文琪,等. 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, 2007, 16(1): 22-27.
- [15] 臧维玲,江敏,张建达,等. 亚硝酸盐和氨对罗氏沼虾幼体的毒性[J]. 上海水产大学学报, 1996, 5(1): 15-22.
- [16] 孙振中,刘淑梅,戚秀渊,等. 非离子氨氮对罗氏沼虾幼体的毒性研究[J]. 水产养殖, 1999, 26(4): 174-176.
- [17] 罗静波,曹志华,蔡太锐. 氨氮对克氏原螯虾幼体的急性毒性研究[J]. 长江大学学报:自然科学版, 2006, 3(4): 183-186.
- [18] 胡贤德,孙成波,蔡鹤翔,等. 不同盐度条件下氨氮对斑节对虾的毒性试验[J]. 广西科学, 2009, 16(2): 206-209.
- [19] 杨其彬,叶乐,温为庚,等. 盐度对斑节对虾蜕壳、存活、生长和饲料转化率的影响[J]. 南方水产, 2008, 4(1): 16-21.
- [20] 陶保华,胡超群,任春华. 弧菌疫苗对斑节对虾和日本对虾免疫预防的作用[J]. 水产学报, 2000, 24(6): 564-569.
- [21] 孙舰军,丁美丽. 氨氮对中国对虾抗病力的影响[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(3): 267-272.
- [22] 哈承旭,刘萍,何玉英,等. 氯化铵对“黄海一号”中国对虾免疫相关酶类的影响[J]. 渔业科学进展, 2009, 30(1): 34-40.
- [23] 王玥,胡义波,姜乃澄. 氨态氮、亚硝态氮对罗氏沼虾免疫相关酶类的影响[J]. 浙江大学学报:理学版, 2005, 32

- (6): 698 - 705.
- [24] 黄旭雄, 周洪琪. 甲壳动物免疫机能的衡量指标及科学评价[J]. 海洋科学, 2007, 31(7): 90 - 96.
- [25] 管小娟. 甲壳动物体液免疫相关酶及免疫因子研究概况[J]. 生命科学仪器, 2009, 7(4): 3 - 7.
- [26] 姜令绪, 潘鲁青, 肖国强. 氨氮对凡纳对虾免疫指标的影响[J]. 中国水产科学, 2004, 11(6): 537 - 541.
- [27] 王专伟, 黄建华, 杨其彬, 等. 感染白斑综合征病毒的斑节对虾免疫酶变化特征[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(9): 1851 - 1854.

The toxicity of ammonia-N on *Penaeus monodon* and immune parameters

LI Yong^{1,2}, YANG Qi-bin¹, SU Tian-feng¹, ZHOU Fa-lin¹, YANG Li-shi¹, HUANG Jian-hua¹

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Guangzhou 510300, Guangdong, China; 2. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The results of acute toxicity test of ammonia-N on *Penaeus monodon* carried out by biological toxicity test showed that effect of toxicity has a significant positive correlation with the ammonia-N maintained time and concentration. In the condition of seawater 30°C, pH = 8, S = 34.5, the half lethal concentration of ammonia-N were 52.63 mg/L, 39.68 mg/L, 31.65 mg/L and 29.94 mg/L, lasting for 24 h, 48 h, 72 h and 96 h respectively, and the safe concentration was 2.99 mg/L. In the same concentration, half lethal concentration of non-ionic ammonia were 3.23 mg/L, 2.43 mg/L, 1.94 mg/L, 1.84 mg/L respectively and the safe concentration was 0.18 mg/L. The effect of ammonia-N level of 29.9 mg/L on immune parameters of *Penaeus monodon* showed the variation trend of different immune parameters: including activity of phenoloxidase (PO) decreasing in the whole of study, superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) activity in serum increasing at first after ammonia-N stimulated and then decreasing, acid phosphatase (ACP) activity increasing at first after ammonia-N stimulated, then decreasing and increasing at last within 96h. ANOVA indicated that the activities of PO, SOD, POD, ACP in eight sampling points (0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h) had significant difference ($P < 0.01$), while the control groups all had no significant difference ($P > 0.05$). Acute toxicity result, changes of different immune parameters in high ammonia-N stress and influence of high ammonia on the immune system obtained in this study provide a scientific basis for the healthy development of culture of *Penaeus monodon*.

Key words: *Penaeus monodon*; ammonia-N; immune parameter