

氨氮对菲律宾蛤仔免疫力的影响

王文琪, 姜令绪, 杨 宁, 李 建, 王仁杰

(莱阳农学院, 山东 青岛 266109)

摘要: 通过氨氮对菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)的急性毒性实验, 发现氨氮质量浓度对数与死亡概率单位之间的相关性方程为 $y=1.827 1x+0.651 9$, $R^2=0.971 9$, 据此方程计算出, 氨氮对菲律宾蛤仔的 24 h 半致死浓度为 239.88 mg/L, 24 h 内引起 5% 个体死亡的氨氮质量浓度为 13.49 mg/L。通过氨氮对菲律宾蛤仔血细胞数量和血淋巴溶菌活力的影响实验, 发现在各取样时间下, 菲律宾蛤仔血细胞数量随着氨氮质量浓度的增加而降低, 且差异显著 ($F > F_{0.05}$); 随着时间的延长, 各个处理组中菲律宾蛤仔的血细胞数量表现出相同的变化趋势, 即在受到氨氮胁迫后 6 h 时达到最低值, 之后有所升高, 但第 12 小时与第 24 小时菲律宾蛤仔血细胞数量无显著差异 ($F < F_{0.05}$)。氨氮对菲律宾蛤仔血淋巴溶菌活力影响显著 ($F > F_{0.05}$), 各取样时间下, 随着氨氮质量浓度的升高, 其血淋巴溶菌活力逐渐降低; 第 6 小时, 各氨氮质量浓度下的溶菌活力均达到最低值, 同一氨氮浓度下第 6, 12, 24 小时时的溶菌活力无显著差异 ($F < F_{0.05}$)。

关键词: 菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*); 氨氮; 免疫力; 血细胞数量; 溶菌活力
中图分类号: Q55 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096 (2007) 01-0023-05

菲律宾蛤仔的免疫是属于非特异性免疫, 血细胞是其抵御系统的最重要的部分, 可进行炎症、伤口修复、呼吸爆发、吞噬和包囊等作用^[1]; 菲律宾蛤仔体液中存在多种活性因子参加免疫反应, 其中溶菌酶是最重要的一种水解酶, 它能够水解革兰氏阳性菌细胞壁上粘性多肽中的已酰胺基多糖, 并使之裂解, 形成一个水解酶体系, 破坏和消除侵入机体的异物, 从而担负起机体的免疫防御功能^[2,3]。

氨氮是导致贝类疾病发生的重要环境因子, 主要由生物排泄物、分泌物以及动植物尸体等含氮有机物分解产生。在水体中以离子氨 (NH_4^+) 和非离子氨 (NH_3) 两种形态存在, 它们之间可以相互转换。据报道^[4, 5]当 pH 小于 7 时, 氨氮几乎都为离子氨, 当 pH 大于 11 时几乎都为非离子氨, 其中非离子氨因为不带电荷, 具有较强的脂溶性, 能够穿透细胞膜, 而表现出毒性效应, 破坏水生动物的鳃组织并渗入血液, 降低其呼吸机能和血液载氧能力, 导致水生动物

缺氧或中毒死亡。因此研究氨氮对菲律宾蛤仔免疫力的影响具有重要意义, 作者根据氨氮对菲律宾蛤仔的 24 h 急性毒性实验结果以及韩家波等^[6]的调查报告设置了多个实验梯度, 研究了氨氮对菲律宾蛤仔血细胞和血淋巴溶菌活力的影响, 以期能为菲律宾蛤仔疾病的防治提供科学的数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*) 于 2005 年 6 月购于青岛市城阳水产品批发市场, 其

收稿日期: 2006-08-10; 修回日期: 2006-11-05

基金项目: 青岛市自然科学基金资助项目 (05-1-JC-87);

莱阳农学院人才基金资助项目 (Y0222)

作者简介: 王文琪 (1969-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 水产养殖, 电话: 0532-86080565, E-mail: wenqiwang@lyac.edu.cn

进出水管活动正常,健康无病,壳长为 4.0 cm±0.28 cm,壳宽为 2.77 cm±0.13 cm 体质量为 10.6 g±2.35g。菲律宾蛤仔在盐度为 30, pH 为 7.6, 温度为 18 ±0.5 的海水中暂养 3 d, 暂养期间不充气, 不投饵, 日换水两次, 每次换水量为 1/2。

1.2 实验梯度设置

1.2.1 氨氮的菲律宾蛤仔急性毒性实验

实验共设置 6 个梯度, 氨氮质量浓度分别为对照组(海水) 50.0、100.0、200.0、400.0、800.0 mg/L, 各梯度用氨氮质量浓度为 10 g/L 的氯化氨溶液调配, 每个梯度设置 3 个平行。实验在体积为 2 L 的塑料水槽中进行, 每个槽分别放置正常菲律宾蛤仔 25 只, 水温为 18 ±0.5, 实验共进行 24 h, 期间不充气, 不投饵, 随时挑出死亡个体, 第 12 小时全换水一次, 并加入相应氨氮浓度的海水, 24 h 时记录各梯度的死亡个体数目。

1.2.2 氨氮对菲律宾蛤仔免疫力的影响实验

实验共设置 5 个梯度, 氨氮浓度分别为对照组(海水) 5.0、10.0、15.0、20.0 mg/L 的实验组, 各梯度用氨氮质量浓度为 10 g/L 的氯化氨溶液调配, 每个梯度设置 3 个平行。实验在体积为 2 L 的塑料水槽中进行, 每个槽分别放置正常菲律宾蛤仔 25 只, 水温为 18 ±0.5, 实验共进行 24 h, 期间不充气, 不投饵, 第 12 小时全换水一次, 并加入相应氨氮浓度的海水。取样时间分别为 6, 12, 24 h, 每次随机取菲律宾蛤仔 6 只, 其中 3 只用于血细胞计数, 另外 3 只用于溶菌活力的测定。

1.3 实验方法

1.3.1 半致死浓度(LC₅₀)的计算

急性毒性实验的半致死浓度(LC₅₀)的计算采用概率单位法。

1.3.2 血淋巴的制备

用滤纸擦干其贝壳上的海水, 然后用 1 mL 无菌一次性注射器(0.45 mm×16 mm 的针头)从菲律宾蛤仔后闭壳肌中取血, 置于 1.5 mL 的离心管中, 备用。

用于血细胞计数的血液, 不需离心, 直接稀释后显微镜下计数。

用于测定溶菌活力的血液经 TGL-16G 台式离心机 3 000 r/min 离心 10 min 取上清液用于测定溶菌活

力。

1.3.3 血细胞数量的计数

血细胞数量^[7]的测定采用血球计数板在光学 Nikon E200 型显微镜下直接计数的方法。

1.3.4 溶菌活力的测定

溶菌活力以溶壁微球菌冻干粉为底物, 参照 Hultmark 等^[8]改进的方法, 并做了适当的调整。

菌悬液的制备: 以溶壁微球菌(*Micrococcus lysolei*)冻干粉为底物, 用 0.1 mol/L, pH 为 6.4 (pH 实验除外)磷酸钾盐缓冲液配成底物悬液, 使其 570 nm 波长处的吸光度值约为 0.35 (现配现用)。

溶菌活力测定: 取 3 mL 上述菌悬液于试管内, 冰浴 10 min (温度在 2 左右, 有悬冰), 之后加入 200 μL (血淋巴添加量实验除外)待测血清振荡混匀, 于 UV-2000 分光光度计 570 nm 波长处测定其吸光度值(A₀), 然后将试管移入 37 (反应温度实验除外)水浴中放置 30 min (反应时间实验除外), 取出后立即置于冰浴中 10 min, 以终止反应, 测其 A 值。溶菌活力按下式计算: $U_L = (A_0 - A) / A$, 式中 U_L 为溶菌活力, A₀ 为起始吸光度值, A 为反应后的吸光度值。

1.3.5 血淋巴蛋白浓度的测定

绘制标准曲线: 取 21 只试管, 分为 7 组, 每组 3 个平行, 用 1.0 g/L 的标准蛋白质溶液给各试管分别加入 0, 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 mL, 然后用无离子水补充到 0.1 mL, 最后各试管中分别加入 5.0 mL 考马斯亮兰 G-250 试剂^[9], 混合 5 min 后在分光光度计上测定各样品在 595 nm 波长处的光吸收值 A₅₉₅。用标准蛋白质量(mg)为横坐标, 用吸光度值 A₅₉₅ 为纵坐标, 作图即得到一条标准曲线。

测定未知样品: 取 3 只试管, 加入 0.1 mL 未知样品, 然后加入 5.0 mL 考马斯亮兰 G-250 试剂, 按照上述方法测出未知样品的 A₅₉₅ 值, 通过标准曲线求出样品的蛋白质浓度。

1.3.6 数据处理与分析

所有实验数据均以 3 个平行数据的平均值表示; 实验数据采用单因素方差分析(ANOVA)。

2 实验结果

2.1 氨氮对菲律宾蛤仔急性毒性实验

表 1 氨氮对菲律宾蛤仔 24 h 急性毒性实验结果

Tab.1 Data of acute toxic experiment of ammonia-N on *Ruditapes philippinarum* for 24 h

氨氮质量浓度(mg/L)	蛤仔数量 (个)	24 h 死亡数 (个)	24 h 死亡率 (%)	lgLC	概率单位
对照 (海水)	75	0	0		
50	75	6	8	1.70	3.59
100	75	26	31	2.00	4.50
200	75	33	44	2.30	4.85
400	75	52	69	2.60	5.50
800	75	60	80	2.90	5.84

表 1 就氨氮对菲律宾蛤仔的 24 h 毒性实验结果进行了统计,随着氨氮浓度的升高,菲律宾蛤仔 24 h 的死亡数逐步增加,为了便于利用“概率单位法”计算半致死浓度,将氨氮浓度换算成对应的对数值,并且查附表得到相应的概率单位。根据浓度对数与概率单位的对应关系绘图(图 1),得两者之间的相关性方程 $y=1.827 1x+0.651 9$, $R^2=0.971 9$,其中 y 代表概率单位, x 代表浓度对数。当死亡率为 50%时,概率单位为 5,根据图 1 公式可计算出半致死浓度对应的对数 $lgLC_{50}=2.38$ 求反对数就得到 24 h 的半致死浓度 $LC_{50}=239.88$ mg/L。此外,当菲律宾蛤仔出现 5%死亡率时,其对应的概率单位是 3.36,根据上述公式可以计算出对应的氨氮浓度对数 $lgLC_5=1.13$,求反对数得 24 h 引起 5%个体死亡的氨氮质量浓度为 13.49 mg/L。

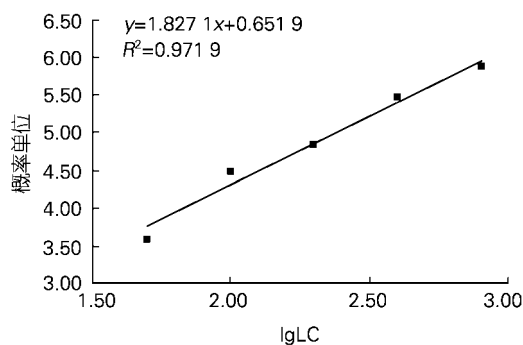


图 1 氨氮对菲律宾蛤仔 24 h 急性毒性实验概率单位-浓度对数相关性

Fig.1 The relationship between the concentration of ammonia-N and death probability of *Ruditapes philippinarum*

2.2 氨氮对菲律宾蛤仔免疫力的影响

2.2.1 氨氮对菲律宾蛤仔血细胞数量的影响

由图 2 可见,各取样时间下,菲律宾蛤仔血细胞数量随着氨氮质量浓度的增加而降低,且差异显著 ($F > F_{0.05}$);随着时间的延长,各个处理组中菲律宾蛤仔的血细胞数量表现出相同的变化趋势,即在受到氨氮胁迫后 6 h 时达到最低值,之后有所升高,但第 12 小时与第 24 小时菲律宾蛤仔血细胞数量无显著差异 ($F < F_{0.05}$)。

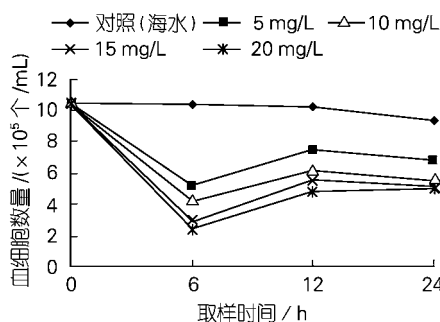


图 2 氨氮对菲律宾蛤仔血细胞数量的影响

Fig.2 Effect of Ammonia-N on the total haemocyte count of *Ruditapes philippinarum*

2.2.2 氨氮对菲律宾蛤仔血淋巴溶菌活力的影响

图 3 表明,氨氮对菲律宾蛤仔血淋巴溶菌活力影响显著 ($F > F_{0.05}$)。各取样时间下,随着氨氮浓度的升高,其血淋巴溶菌活力逐渐降低;第 6 小时,各氨氮质量浓度下的溶菌活力均达到最低值,同一氨氮质量浓度下第 6, 12, 24 小时时的溶菌活力无显著差异 ($F < F_{0.05}$)。

3 讨论

3.1 菲律宾蛤仔的氨氮半致死浓度

本研究的氨氮对菲律宾蛤仔的 24 h 急性毒性实

验,发现氨氮对菲律宾蛤仔的死亡率具有显著影响,在给定的氨氮质量浓度(50~800 mg/L)范围内,氨氮质量浓度与菲律宾蛤仔的死亡率呈正相关性。由此表明,氨氮对菲律宾蛤仔具有毒性作用,其24 h的半致死浓度为239.88 mg/L,引起5%个体死亡的氨氮质量浓度为13.49 mg/L。这与韩家波等^[6]对辽宁沿海某贝类养殖场的滩涂调查,发现滩涂底质中氨氮质量比在5.77~19.63 mg/kg范围内,随着氨氮质量比的增加,滩涂贝类的死亡情况越严重的结果吻合。可见,氨氮对菲律宾蛤仔的存活具有较大影响。

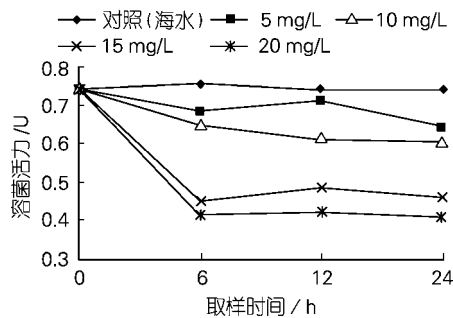


图3 氨氮对菲律宾蛤仔血淋巴溶菌活力的影响
Fig.3 Effect of Ammonia-N on the bacteriolytic activity of *Ruditapes philippinarum*

3.2 氨氮对菲律宾蛤仔免疫力的影响

氨氮是反映水质污染情况的重要指标,氨氮在水体中以离子氨(NH_4^+)和非离子氨(NH_3)两种形态存在,其中非离子氨因为不带电荷,具有较强的脂溶性,能够穿透细胞膜,而表现出毒性效应。有关当氨氮达到一定浓度时,对水生生物的生长、发育、免疫力等产生危害方面已有许多报道。孙建军等^[10]研究发现处于高氨氮质量浓度(2.5 mg/L)下20 d,对虾血细胞数量明显减少,溶菌活力下降,对病原菌的易感性提高;Le Moullac等^[11]研究发现氨氮质量浓度升高(0→3.0 mg/L),对虾血细胞数量降低约50%。本实验发现在各取样时间下,菲律宾蛤仔血细胞数量、血淋巴溶菌活力随着氨氮浓度的增加而降低,且差异显著($F > F_{0.05}$);随着时间的延长,各个处理组中菲律宾蛤仔的血细胞数量、溶菌活力均表现出相同的变化趋势,即血细胞数量在受到氨氮胁迫后6 h时达到最低值,之后有所升高达到稳定。可见,氨氮对菲律宾蛤仔的免疫力具有明显的影响。因此作者认为氨氮浓度

升高后的短时间内,直接影响了菲律宾蛤仔的呼吸、离子调节($\text{NH}_4^+/\text{Na}^+$)、氮代谢等相关生理功能,菲律宾蛤仔因应激反应导致机体能量需求增加,而通过厌氧呼吸来补充能量,却同时产生大量的乳酸盐,破坏血淋巴的酸碱平衡,导致血淋巴pH升高,引发呼吸性碱中毒及机体生理代谢失调等系列的变化,导致了机体免疫力的明显下降,对病原的易感性提高,从而容易暴发疾病。

在菲律宾蛤仔的养殖过程中,氨氮浓度突变是一个比较重要的胁迫因子,当氨氮超过5mg/L或长时间维持在较高的水平上时,便会导致菲律宾蛤仔的免疫力显著下降,要及时采取措施降低氨氮浓度,防止病害的爆发。

参考文献:

- [1] 刘世良,麦康森.贝类免疫系统和机理的研究进展[J]. 海洋学报, 2003, 25(2): 95-105.
- [2] 刘树青,江晓路,牟海津.免疫多糖对中国对虾血清溶菌酶、磷酸酶和过氧化物酶的作用[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(3): 278-283.
- [3] 王雷,李光友,毛远兴.中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力与酚氧化酶活力的测定及其特性研究[J]. 海洋与湖沼, 1995, 26(2): 179-185.
- [4] 方志山.杏林虾池日本对虾死亡原因的探讨[J]. 海洋科学, 2003, 27(1): 14-17.
- [5] 董乔仕.养殖水体氨氮的危害与改良[J]. 齐鲁渔业, 2002, 19(9): 10.
- [6] 韩家波,薛克,吕建发,等.辽宁沿海滩涂贝类死亡调查[J]. 水产科学, 1994, 13: 12-13.
- [7] Bassem A, Kathryn A, Ashton A, et al. Haemocyte parameters associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapes* spp.[J]. *Clams Eur Developmental and Comparative Immunology*, 2001, 25:365-375.
- [8] Hultmark D, Steiner H, Rasmusn T, et al. Insect immunity: purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*[J]. *Eur J Biochem*, 1980, 106:7-16.
- [9] 陈缘,周玫.自由基医学基础与病理生理[M]. 北京:科技出版社, 1994.67-69.
- [10] 孙建军,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.
- [11] Le Moullac G, Haffner P. Environmental factors affecting immune responses in crustacea[J]. *Aquaculture*, 2000, 191:121-131.

The effect of ammonia-N on immune activity of *Ruditapes philippinarum*

WANG Wen-qi, JIANG Ling-xu, YANG Ning, LI Jian, WANG Ren-jie

(Lai Yang Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Received: Aug., 10, 2006

Key words: *Ruditapes philippinarum*; ammonia-N; immune activity; total haemocyte count; bacteriolytic activity

Abstract: By the acute toxic experiment on *Ruditapes philippinarum* of ammonia-N, the related equation between the concentration of ammonia-N and the mortality of *R. philippinarum* was $y = 1.827 1x + 0.651 9$, $R^2 = 0.971 9$. According to this equation, it was calculated that the half death in 24 h of *R. philippinarum* was about 239.88 mg/L, the concentration of ammonia-N which caused 5% death in 24h was 13.49 mg/L. By the experiment on the influence of ammonia-N on the number of haemocyte and the bacteriolytic activity, it was found that the number of haemocytes of *R. philippinarum* decreased as increasing the concentration of ammonia-N in different times, and their difference was remarkable ($F > F_{0.05}$). As the time increasing, there was the same change trend of the number of haemocyte of *R. philippinarum*. It reached minimum when reacted for 6h, after which it became increased. The number of haemocyte had no significant difference in the 12h and 24h ($F > F_{0.05}$) reaction times.

(本文编辑: 张培新)

(上接第 16页)

Avian community diversity during winter in Xiamen wetlands

FANG Wen-zhen¹, CHEN Zhi-hong², CHEN Xiao-lin¹, LIN Qing-xian¹

(1. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Xiamen Institute of Environmental Protection, Xiamen 361006, China)

Received: Dec., 8, 2003

Key words: wetland bird; community diversity; water bird; wader; environmental impact

Abstract: The bird species and their relative abundance were investigated on the twelve quadrats in Xiamen wetlands from December 1999 to February 2000. Seven environmental parameters were selected for analyzing the main impact factors on the bird community diversity of this area. The results showed that there were 15 families and 45 species of birds found in Xiamen wetlands during the research period. The dominant species were Tufted Duck (*Aythya fuligula*), Black-headed Gull (*Larus ridibundus*), Dunlin (*Calidris alpina*) and Little Egret (*Egretta garzetta*), and the individual number of these 4 species occupied 76% of the total individual number. Little Egret was the commonest bird, which distributed in every quadrat of the area. There is a relationship between the similarities of bird communities and the similarities of sediment types of wetland. The factors mainly influencing the bird community diversity are artificial building, traffic disturbance, aquaculture and terrestrial vegetation, and those highly influencing the population density of wetland bird are the water salinity and traffic disturbance.

(本文编辑: 刘珊珊)