

氨氮胁迫对方斑东风螺六种免疫酶活性的影响

谭春明^{1,2,3}, 赵 旺^{1,2,3}, 吴开畅^{1,2}, 张 玥⁴, 杨 蕊^{1,3}, 温为庚^{1,2,3},
陈 旭^{1,2,3}, 于 刚^{1,2}

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 热带水产研究开发中心, 海南 三亚 572018; 2. 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300; 3. 三亚热带水产研究院, 海南 三亚 572018; 4. 海南大学, 海洋学院, 海南 海口 570228)

摘要: 本文研究了氨氮对方斑东风螺(*Babylonia areolata*)的急性毒性及不同浓度的氨氮溶液(22、47.5、102 和 220 mg/L)对其体内六种免疫酶过氧化氢酶(CAT)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)和过氧化物酶(POD)活性的影响。实验结果表明: 氨氮浓度越大, 其毒性作用越强, 方斑东风螺死亡率越高; 500 mg/L 氨氮处理组于 24 h 便出现(20.3±2.1)%死亡率, 并且 96 h 后存活率降为 0。而相同条件下, 随试验时间的延长, 方斑东风螺死亡率也越高。氨氮浓度和处理时间均对方斑东风螺免疫酶活力有显著的影响($P < 0.05$)。与对照组相比, 处理组 CAT 和 AKP 活性均表现出“诱导-抑制”的趋势, ACP 和 T-SOD 活性表现出“抑制-诱导”的趋势, CSH-PX 活性呈现“诱导-抑制-诱导”的趋势, 而氨氮对处理个体 POD 活性的影响整体表现为抑制作用。可见, 养殖水体中的氨氮对方斑东风螺免疫酶活性产生较大的影响。本研究从生态现象和生理指标相结合的方式阐述了氨氮对方斑东风螺个体的致毒特性, 对方斑东风螺的养殖具有实用意义, 同时丰富了氨氮对贝类毒理实验免疫性能层面的基础数据, 并为其他贝类氨氮胁迫实验提供参考。

关键词: 方斑东风螺(*Babylonia areolata*); 氨氮胁迫; 免疫酶

中图分类号: S917.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2019)04-0008-08

DOI: 10.11759/hyxx20190110002

氨氮是水产养殖环境中的主要有毒物质之一, 也是水产养殖中重要的水体环境指标与常见胁迫因子。其浓度受到养殖水体中的动物排泄物、分泌物、残饵、动植物尸体等含氮有机物经微生物分解的影响^[1-2]。研究表明, 多数水生生物对氨氮毒性非常敏感, 已有不少关于氨氮对水生生物(如鱼类、虾类等)抗病力影响的研究^[3-5], 而氨氮胁迫对贝类抗病力影响的研究却较少, 有关氨氮对方斑东风螺免疫酶活力方面影响的研究仍属空白。王程昊等^[6]在研究氨氮胁迫对泥蚶免疫酶活性的影响时发现, 随着氨氮浓度的增加, 抗氧化酶活性和磷酸酶活性表现出“抑制-诱导”的趋势; 樊甄姣等^[7]研究了氨氮对栉孔扇贝血淋巴活性氧含量和抗氧化酶活性的影响, 进一步揭示适当的氨氮刺激可增加细胞内外活性氧的含量, 从而增强扇贝的两种抗氧化酶活性; 刘洪展等^[8]研究发现, 氨氮胁迫也影响刺参体内的几种免疫酶活性。氨氮可降低水生动物生长速度, 伤害其血液生化指标、免疫功能、组织机

构以及繁殖能力^[9]。水体中氨氮浓度低于生物体耐受限度时, 机体能够自行调节其免疫能力从而适应外界环境的变化, 但是一定浓度的氨氮持续长时间刺激且超过机体调节限度时, 机体的非特异性免疫系统尤其是抗氧化系统会受到破坏, 免疫力及部分抗氧化物质含量与酶活性下降, 从而影响水生动物健康^[10-12]。

方斑东风螺(*Babylonia areolata*)属软体动物门、腹足纲、蛾螺科, 分布于中国东南沿海、东南亚及日

收稿日期: 2019-01-10; 修回日期: 2019-02-22

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-49); 广东省渔港建设和渔业产业发展专项(海洋渔业科技推广方向-科技攻关与研发项目, A201601B11); 海南省自然科学基金青年基金项目(318QN304); 三亚市院地科技合作项目(2018YD19)

[Foundation: Modern Agro-industry Technology Research System (CARS-49); Special Fund for Fishing Port Construction and Fishery Industry Development of Guangdong Province (A201601B11); Hainan Natural Science Foundation for Youth (318QN304); Project of Academy Locality Science and Technology Cooperation of Sanya City (2018YD19)]

作者简介: 谭春明(1991-), 男, 江西赣州人, 硕士, 研究实习生, 研究方向: 水产养殖及高值化利用, E-mail: cmtan_ouc@163.com; 于刚(1972-), 男, 通信作者, 博士, 研究员, 研究方向: 水产养殖及高值化利用, E-mail: gyu0928@163.com

本等,在广东俗称“花螺”、“海猪螺”和“南风螺”,其肉质鲜美、营养丰富,是一种畅销国内外且具有推广前景的优质海水养殖贝类品种^[13]。近年来,在中国沿海地区方斑东风螺的养殖生产有了较快发展。然而,养殖水体中氨氮的积累,给鱼贝类的生长繁殖带来巨大危害。本文以方斑东风螺为研究对象,通过氨氮胁迫实验,测定氨氮对方斑东风螺常见免疫酶活性的影响,以期更好地了解方斑东风螺的免疫响应,为其病害防治提供一定的理论依据,为方斑东风螺养殖过程中的氨氮控制提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料

方斑东风螺由热带水产研究开发中心(海南,陵水)提供并在该基地进行试验。实验所用方斑东风螺的平均质量为 (0.392 ± 0.080) g,体长 (0.65 ± 0.15) cm,年龄3个月,试验开始前先进行2天的海水暂养。方斑东风螺养殖过程中水质参数:盐度 33 ± 0.8 ,温度 $(26.0 \pm 1.0)^{\circ}\text{C}$,pH为 8.0 ± 0.2 ,溶氧大于6.5 mg/L,亚硝态氮($\text{NO}_2\text{-N}$)浓度小于0.04 mg/L,氨氮($\text{NH}_4\text{-N}$)浓度小于0.01 mg/L(实验前)。实验过程中实验用水为过滤的海水,总蛋白及各酶活测定试剂盒购买自南京建成生物工程研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 实验设计

将氯化铵(AR)配置成浓度为0~500 mg/L的溶液,按试验要求放入健康状况良好且大小均一的方斑东风螺,观察其摄食行为、活动及存活状况,得到24 h和96 h 100%死亡质量浓度[LC_{100} , 24 h)和(LC_{100} , 96 h)],根据实验结果确定实验液浓度的上、下限并设立各实验液的浓度。

经试验计算后设置5个氯化铵梯度浓度分别为0、22、47.5、102、220 mg/L(0为对照组,其余四组依此对应标号1—4),各组均为3个平行,每个实验容器(3 L)内投放30只健康良好的方斑东风螺,分别于6、12、24、36、48、72和96 h这7个时间点从各个养殖容器随机取样3只检测其免疫酶活力的变化情况。同时,每隔3 h从每个容器中采取水样100 mL,进行水样调配比实验并根据实验结果及时调整到设定的表观浓度。

每日换水1次,每次换水50%,每24 h投喂一定量冰鲜鱼,并将养殖桶中排泄物、剩余饵料以及死去的方斑东风螺及时除去。间隔观察中毒症状,并记

录各试验组方斑东风螺的摄食状态、活动行为、中毒症状以及死亡率,死亡的判断标准为试验螺置于塑料板上无明显活动迹象,用解剖刀触碰无反应。

1.2.2 样品处理

用0.2 mol/L生理盐水将各试验组所取整个组织样品按质量:体积为1:2比例进行研磨,研磨液于 4°C 、5 000 r/min离心10 min,取上清1 mL于洁净EP(ependorf)管中,置于 -80°C 冰箱待测总蛋白、过氧化氢酶(CAT)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)和过氧化物酶(POD)。

1.2.3 数据处理与分析

实验数据的统计分析利用SPSS 21.0进行,先对数据作单因素方差分析(ANOVA),处理间若有显著差异,再用Duncan法比较均值间的差异显著性($P < 0.05$),本论文中数据采用 $\text{Mean} \pm \text{SD}$ 表达。为了更好的呈现酶活的变化情况(诱导或抑制),定义酶活力相对百分比=(实验组酶活力/对照组酶活力) $\times 100\%$ 。

2 实验结果

2.1 氨氮胁迫对方斑东风螺行为及存活率的影响

在氯化铵处理组中,随着氯化铵浓度的升高,方斑东风螺表现不同程度的应激行为甚至死亡。受氨氮胁迫后,方斑东风螺主要表现为运动缓慢,对外界刺激反应迟钝,爬壁运动减少,逐渐翻背,沉于水桶底部,身体僵硬直至死亡。死亡状态的方斑东风螺,吻管向外凸出,螺肉外翻、惨白僵硬。300 mg/L氯化铵处理组48 h开始出现死亡,96 h存活率为 $(60.0 \pm 1.6)\%$,而500 mg/L氨氮处理组于24 h便出现 $(20.3 \pm 2.1)\%$ 死亡率,死亡个体吻稍微张开、个体出现体色变红现象,并96 h存活率为0,其余各组存活率为100%(见表1)。可见,氨氮浓度越大,其毒性作用越强,方斑东风螺死亡率越高;相同条件下,随试验时间的延长,方斑东风螺死亡率也越高。

2.2 氨氮胁迫对方斑东风螺CAT活性的影响

氨氮胁迫对方斑东风螺CAT活性的影响见图1。实验结果表明,各浓度处理时间对方斑东风螺CAT活性影响极显著($P < 0.01$),而不同浓度氨氮胁迫对各处理组CAT活性影响存在明显差异($P < 0.05$)。相比对照组,在处理时间为6 h、氨氮浓度为102 mg/L时,方斑东风螺处理个体CAT的活性有所降低,其

它各处理组个体 CAT 活性均表现为诱导作用,但是,随着氨氮处理时间的不断延长,各浓度处理组均表

现为先抑制后诱导并最终均表现为抑制状态。总体来看, CAT 活性表现出“诱导-抑制”的趋势。

表 1 氨氮对方斑东风螺急性毒性实验结果

Tab. 1 Acute toxicity experiment of ammonia-N to *B. areolata*

NH ₄ Cl 浓度 (mg/L)	死亡率/%				行为			
	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h
对照	0	0	0	0	正常	正常	正常	正常
25	0	0	0	0	正常	正常	正常	迟缓
50	0	0	0	0	迟缓	迟缓	迟缓	有翻背
75	0	0	0	0	迟缓	迟缓	有翻背	有翻倍
100	0	0	0	0	迟缓	迟缓	有翻背	有翻背
200	0	0	0	0	有翻背	有翻背	有翻背	全翻背
300	0	21.4±3.3	40.1±2.9	60.0±1.6	全翻背	全翻背	全翻背	全翻背
500	20.3±2.1	50.0±2.7	73.6±4.2	100.0	全翻背	全翻背	全翻背	全死亡

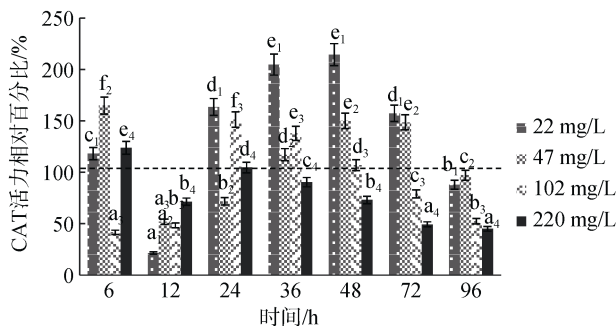


图 1 氨氮对方斑东风螺 CAT 活性的影响

Fig. 1 Effect of ammonia-N concentrations on CAT activities of *B. areolata*

注: 字母 a~f 不同表示二者之间存在显著性差异, 下标数字表示组号

2.3 氨氮胁迫对方斑东风螺 ACP 活性的影响

氨氮胁迫对方斑东风螺 ACP 活性的影响见图 2。实验结果表明, 处理时间和不同浓度氨氮胁迫均显著影响方斑东风螺 ACP 活性($P < 0.05$)。相比对照组, 在氨氮浓度为 220 mg/L 时, 方斑东风螺处理个体 ACP 的活性显著上升, 之后, 随着处理时间的不断增加, ACP 活性呈现抑制趋势。氨氮浓度为 102 mg/L 的处理组个体 ACP 活性在轻微抑制之后随时间变化显著提高, 而其他各处理组仅表现轻微的抑制-诱导作用。可见, 高浓度氨氮处理组(220 mg/L) ACP 活性表现出“诱导-抑制”的趋势, 低中浓度处理组(22、47、102 mg/L)表现出“抑制-诱导”的趋势。

2.4 氨氮胁迫对方斑东风螺 AKP 活性的影响

氨氮胁迫对方斑东风螺 AKP 活性的影响见图 3。

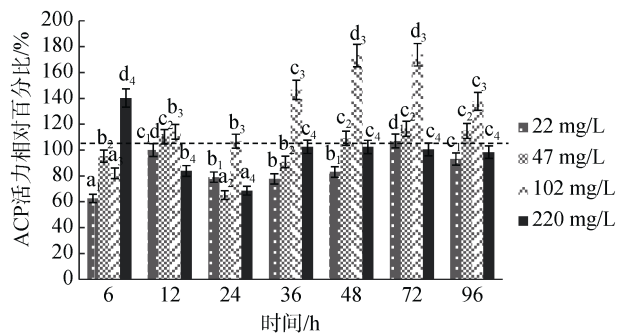


图 2 氨氮对方斑东风螺 ACP 活性的影响

Fig. 2 Effect of ammonia-N concentrations on ACP activities of *B. areolata*

注: 字母 a~f 不同表示二者之间存在显著性差异, 下标数字表示组号

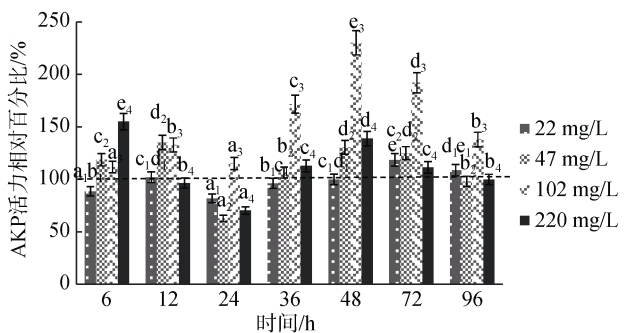


图 3 氨氮对方斑东风螺 AKP 活性的影响

Fig. 3 Effect of ammonia-N concentrations on AKP activities of *B. areolata*

注: 字母 a~f 不同表示二者之间存在显著性差异, 下标数字表示组号

实验结果表明, 处理时间对方斑东风螺 AKP 活性影响极显著($P < 0.01$), 不同浓度氨氮胁迫对各处理组 AKP 活性影响同样存在明显差异($P < 0.05$)。相比对照

组,低氨氮处理组(22 mg/L)个体 AKP 的活性随着处理时间的不断变化呈现“抑制-诱导”的趋势。而其他处理组均呈现“诱导-抑制-诱导”的变化趋势。

2.5 氨氮胁迫对方斑东风螺 T-SOD 活性的影响

氨氮胁迫对方斑东风螺 T-SOD 活性的影响见图 4。可知,处理时间对方斑东风螺 T-SOD 活性影响极显著($P<0.01$),不同浓度氨氮胁迫对各处理组 T-SOD 活性影响也存在明显差异($P<0.05$)。相比对照组,低、中浓度处理组(22、47 mg/L)均表现为诱导作用,而中、高浓度处理组(102、220 mg/L)随时间的变化呈现“诱导-抑制-诱导”的趋势,只在 12 h 处表现为抑制作用。各胁迫组个体 T-SOD 活性在试验终止时(即 96 h)均显著高于对照组($P<0.05$)。

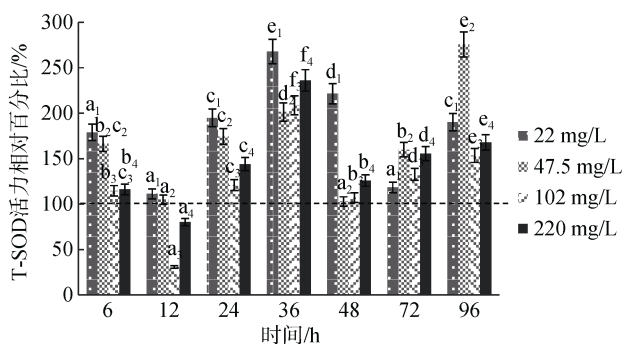


图 4 氨氮对方斑东风螺 T-SOD 活性的影响

Fig. 4 Effect of ammonia-N concentrations on T-SOD activities of *B. areolata*

注: 字母 a~f 不同表示二者之间存在显著性差异,下标数字表示组号

2.6 氨氮胁迫对方斑东风螺 GSH-PX 活性的影响

氨氮胁迫对方斑东风螺 GSH-PX 活性的影响见图 5。可知,处理时间对方斑东风螺 GSH-PX 活性影响极显著($P<0.01$),不同浓度氨氮胁迫对各处理组 GSH-PX 活性影响存在明显差异($P<0.05$)。相比对照组,各浓度处理组方斑东风螺个体 GSH-PX 活性均呈“诱导-抑制-诱导”的变化趋势,谷值均在 24 h 处。试验终止时,低、高处理组(22、220 mg/L)个体 GSH-PX 活性与对照组相比略有下降,而 47 mg/L 和 102 mg/L 处理组仍表现为诱导,只是诱导作用相比 72 h 有所减弱。

2.7 氨氮胁迫对方斑东风螺 POD 活性的影响

氨氮胁迫对方斑东风螺 POD 活性的影响见图 6。

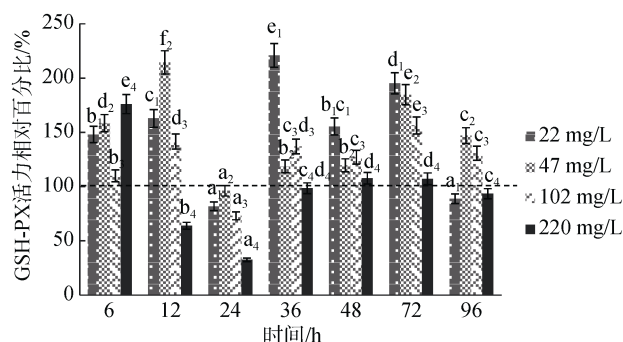


图 5 氨氮对方斑东风螺 GSH-PX 活性的影响

Fig. 5 Effect of ammonia-N concentrations on GSH-PX activities of *B. areolata*

注: 字母 a~f 不同表示二者之间存在显著性差异,下标数字表示组号

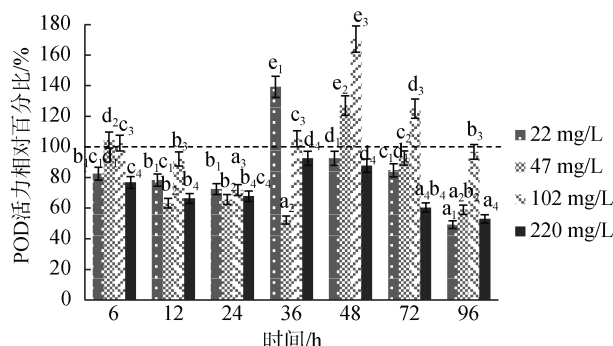


图 6 氨氮对方斑东风螺 POD 活性的影响

Fig. 6 Effect of ammonia-N concentrations on POD activities of *B. areolata*

注: 字母 a~f 不同表示二者之间存在显著性差异,下标数字表示组号

实验结果表明,处理时间对方斑东风螺 POD 活性影响极显著($P<0.01$),不同浓度氨氮胁迫对各组处理个体 POD 活性变化趋势短时间内不存在明显差异($P>0.05$)。相比对照组,220 mg/L 处理组个体 POD 活性在各时间段均受到抑制,22 mg/L 和 47 mg/L 处理组分别在 36 h 和 48 h 处 POD 活性显著高于对照($P<0.05$);102 mg/L 处理组个体 POD 活性在 48 h 和 72 h 处高于对照组。试验终止时,除 102 mg/L 处理组略微降低外,其他各胁迫组个体 POD 活性均显著低于对照组($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 氨氮对方斑东风螺个体的急性毒性

该氨氮胁迫试验中,方斑东风螺表现不同程度的中毒现象。从个体存活及对氨氮表现耐受性两方面来看,方斑东风螺耐受范围较宽,体现出了较强

的抗逆性。实验结果与师尚丽^[14]等人的研究呈现相一致的规律,氨氮浓度越大,其毒性作用越强,方斑东风螺死亡率越高;相同条件下,随试验时间的延长,方斑东风螺死亡率也越高。因此,养殖生产中应尽可能的降低养殖水体中氨氮的浓度,同时防止含氮有机物分解产生 $\text{NH}_3\text{-N}$,及时清理投喂的冰鲜鱼、虾蟹肉等残渣以及死亡的方斑东风螺等。另外,方斑东风螺对氨氮的应激行为表现为运动缓慢、对外界刺激反应迟钝和爬壁运动减少等,可能是氨氮影响了方斑东风螺的组织器官,如影响肌肉伸缩能力和神经介质传递。

3.2 氨氮对方斑东风螺个体免疫酶活性的影响

在养殖水体中,氨氮常以离子氨(NH_4^+)和非离子氨(NH_3)的形式存在并积累,其中 NH_3 因不带电荷,具有较强的脂溶性,能够穿透贝体细胞膜,进而对鱼贝类的生长繁殖带来危害^[14-16]。大量研究表明,氨氮会对鱼贝类等水产动物的生长摄食、血液指标、组织器官和免疫机能产生消极影响^[17-21],还能降低鱼虾贝类的产卵能力^[22],引起血淋巴理化因子和抗病力有关的酶活力的变化^[23],进而降低防御能力。水生动物非特异性免疫系统在应对逆环境应激时起主导作用,其中过氧化氢酶(CAT)、酸性磷酸酶(ACP)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)以及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)等在免疫调节过程中占重要地位^[24-26]。该研究针对氨氮胁迫下的方斑东风螺个体进行了6种免疫酶测定分析,结果表明,无论是胁迫剂量还是胁迫时间均对各免疫酶活存在显著的影响。与对照组相比,随着处理时间的变化,总体上CAT和AKP活性均表现出“诱导-抑制”的趋势,而ACP和T-SOD活性表现出“抑制-诱导”的趋势。王程昊等^[6]在研究氨氮胁迫对泥蚶免疫酶活性的影响时也发现,随着氨氮浓度的增加,总体上CAT活性和AKP活性表现出“诱导-抑制”的趋势,而ACP和T-SOD活性表现出“抑制-诱导”的趋势。而抗氧化相关免疫酶活性的提高可能是贝类在氨氮胁迫环境下,活性氧自由基大量产生,机体处于过氧化状态,为保持抗氧化系统的动态平衡,抗氧化酶活力增加,才能消除机体产生的过量活性氧。但随着氨氮浓度和处理时间的增加,机体产生的大量活性氧已超过抗氧化系统的清除能力,进而对细胞结构造成氧化损伤,并使抗氧化酶CAT活性降低^[21]。这一发现也支持了其他鱼贝类的研究结果,如陈昌生等^[27]研究

了氨氮对九孔鲍过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活力的影响,发现CAT和SOD活性随着氨氮浓度的增加呈现先促进后抑制;徐立红等^[28]指出,当鱼体受到轻度逆境胁迫时,AKP、CAT、SOD等活性被诱导,而受重度逆境胁迫时,其活性则被抑制。然而,随着氨氮处理时间的变化,CSH-PX活性呈现“诱导—抑制—诱导”的趋势,而氨氮处理组个体POD活性的影响整体表现为抑制作用。研究指出,这一现象的发生不再是氧化应激的结果,而可能是细胞代谢发生一定程度的改变,长时间在高浓度的氨氮胁迫下,抗氧化体系不能及时清除自由基,机体的氧化与抗氧化平衡被破坏,致使自由基在鱼体内累积,从而对细胞产生氧化损伤^[29-30];同时,机体抗氧化酶体系也受到破坏,表现为酶活性持续降低^[31]。研究表明,在氨氮超过生物体最大耐受量及超时胁迫下其抗氧化体系受到破坏,导致鱼体的抵抗力和免疫力下降,容易患病^[29, 32]。在一定程度上,免疫酶活性恢复正常水平的时间反映了机体对环境的适应能力。

然而,各免疫酶活性随着处理浓度的变化虽然具有显著性但是变化规律较特异,并不存在明显的线性关系或一致规律,这可能与方斑东风螺的所处发育阶段不同、免疫能力或高抗逆性等生理习性有关,也可能是其免疫系统在氨氮的胁迫造成了一定的紊乱,但胁迫处理剂量仍在其适应范围内。同时也有不少研究表明实验对象规格不同、养殖密度不同以及包括溶氧、投饵残存量等在内的环境因子不同,亦可造成氨氮胁迫程度的显著差异^[33-34]。

4 结论

养殖水体中的氨氮对方斑东风螺免疫酶活性产生较大的影响。研究表明,氨氮浓度越大,其毒性作用越强,方斑东风螺死亡率越高;而相同条件下,随试验时间的延长,方斑东风螺死亡率也越高。氨氮浓度和处理时间均对方斑东风螺免疫酶活力有显著的影响($P < 0.05$),当方斑东风螺受到轻度逆境胁迫时,CAT、AKP、T-SOD、ACP和CSH-PX活性被诱导,而受重度逆境胁迫时,其活性则被抑制。这就警示我们在养殖方斑东风螺及其他水生动物的过程中,应采用一定的方法减少水体中高浓度氨氮带来的应激反应,将氨氮对养殖动物的危害降到最低。

参考文献:

- [1] 程炜轩,梁旭方,符云,等. 高温季节鳊及饵料鱼池塘水质调查研究[J]. 南方水产科学, 2011, 7(4): 43-48.

- Cheng Weixuan, Liang Xufang, Fu Yun, et al. Research on water quality of ponds for *Siniperca chuatsi* and bait fish in hot season[J]. South China Fisheries Science, 2011, 7(4): 43-48.
- [2] 董乔仕. 养殖水体氨氮的危害与改良[J]. 齐鲁渔业, 2002, 19(9): 10.
Dong Qiaoshi. Harm and improvement of ammonia-nitrogen in aquaculture water[J]. Shandong Fisheries, 2002, 19(9): 10.
- [3] Liu Yajuan, Hu Jing, Zhou Shengjie, et al. Effect of acute ammonia stress on antioxidant enzymes and digestive enzymes in *Barramundi lates calcarifer* larvae[J]. Society of Israeli Aquaculture & Marine Biotechnology, 2018, 70: 1508-1519.
- [4] 王贞杰, 陈四清, 曹栋正, 等. 急性氨氮胁迫对圆斑星鲃 (*Verasper variegates*) 幼鱼鳃和肝组织结构及相关酶活性的影响[J]. 渔业科学进展, 2017, 38(2): 59-69.
Wang Zhenjie, Chen Siqing, Cao Dongzheng, et al. Effects of acute ammonia nitrogen stress on histopathology of gill and liver and enzyme activities of juvenile *Verasper variegatus*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(2): 59-69.
- [5] 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.
Sun jianjun, Ding Meili. Effect of ammonia-N on anti-disease ability of *Penaeus Chinensis*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1999, 30(3): 267-272.
- [6] 王程昊, 钱琦凡, 张耀尹, 等. 氨氮胁迫对泥蚶免疫酶活性的影响[J]. 水产研究, 2017, 4(3): 65-70.
Wang Chenghao, Qian Qifan, Zhang Yaoyi, et al. Effects of ammonia-N stress on the activities of immune enzymes of *Tegillarca granosa*[J]. Fisheries Research, 2017, 4(3): 65-70.
- [7] 樊甄姣, 刘志鸿, 杨爱国. 氨氮对栉孔扇贝血淋巴活性氧含量和抗氧化酶活性的影响[J]. 海洋水产研究, 2005, 26(1): 23-27.
Fan Zhenjiao, Liu Zhihong, Yang Aiguo. Effect of ammonia-N on the content of ROIs and the activities of antioxidant enzyme in the haemolymph of *Chlamys farreri*[J]. Marine Fisheries Research, 2005, 26(1): 23-27.
- [8] 刘洪展, 郑风荣, 孙修勤, 等. 氨氮胁迫对刺参几种免疫酶活性的影响[J]. 海洋科学, 2012, 36(8): 47-52.
Liu Hongzhan, Zheng Fengrong, Sun Xiuqin, et al. Effects of exposure to ammonia nitrogen stress on immune enzymes of holothurian *Apostichopus japonicus*[J]. Marine Sciences, 2012, 36(8): 47-52.
- [9] 韩春艳, 郑清梅, 陈桂丹, 等. 氨氮胁迫对奥尼罗非鱼非特异性免疫的影响[J]. 南方水产科学, 2014, 10(3): 47-52.
Han Chunyan, Zheng Qingmei, Chen Guidan, et al. Effect of ammonia-N stress on non-specific immunity of tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. South China Fisheries Science, 2014, 10(3): 47-52.
- [10] 邱德全, 周鲜娇, 丘明生. 氨氮胁迫下凡纳滨对虾抗病力和副溶血弧菌噬菌体防病效果研究[J]. 水生生物学报, 2008, 32(4): 455-461.
Qiu Dequan, Zhou Xianjiao, Qiu Mingsheng. Study on anti-disease ability of *Litopenaeus vannamei* and the biological control of vibrio parahaemolyticus bacteriophage under stresses of ammonia nitrogen[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2008, 32(4): 455-461.
- [11] Romano N, Zeng C. Ontogenetic changes in tolerance to acute ammonia exposure and associated gill histological alterations during early juvenile development of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*[J]. Aquaculture, 2007, 266(1): 246-254.
- [12] 张亚娟, 王超, 刘存歧, 等. 氨态氮和亚硝态氮对日本沼虾酚氧化酶活力及血蓝蛋白含量的影响[J]. 水产科学, 2010, 29(1): 31-34.
Zhang Yajuan, Wang Chao, Liu Cunqi, et al. Effects of ammonia-N and nitrite-N on phenoloxidase activity and hemocyanin content in hemolymph of prawn *Macrobrachium nipponense*[J]. Fisheries Science, 2010, 29(1): 31-34.
- [13] 钟鸿干, 王冬梅, 王国福. 东风螺的营养与饵料研究进展[J]. 河北渔业, 2012(9): 50-53.
Zhong Honggan, Wang Dongmei, Wang guofu. Advances in research on nutrition and diet of *Babylonia*[J]. Hebei Fisheries, 2012(9): 50-53.
- [14] 师尚丽, 冯奕成, 郑莲, 等. 不同 pH 和盐度下氨氮对方斑东风螺的毒性研究[J]. 湛江海洋大学学报, 2005, 11(6): 36-40.
Shi Shangli, Feng Yicheng, Zheng Lian, et al. Toxicity of ammonia-N in *Babylonia areolata* at different pH and salinity[J]. Journal of Zhanjiang Ocean University, 2005, 11(6): 36-40.
- [15] 乔顺风, 刘恒义, 靳秀云, 等. 养殖水体氨氮积累危害与生物利用[J]. 河北渔业, 2006(1): 20-22.
Qiao Shunfeng, Liu Hengyi, Jinxiuyun, et al. Damage and biological utilization of ammonia nitrogen accumulation in aquaculture water[J]. Hebei Fisheries, 2006(1): 20-22.
- [16] 魏国富. 淡水养殖水体氨氮成分累积的危害性分析[J]. 南方农业, 2015, 9(21): 205-207.
Wei Guofu. Hazard analysis of ammonia nitrogen accumulation in freshwater aquaculture[J]. South China Agriculture, 2015, 9(21): 205-207.
- [17] 余瑞兰, 聂湘平, 魏泰莉, 等. 分子氨和亚硝酸盐对鱼类的危害及其对策[J]. 中国水产科学, 1999, 6(3): 73-77.
Yu Ruilan, Nie Xiangping, Wei Taili, et al. Toxicity of

- molecular ammonia and nitrite to fish and the control measures[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1999, 6(3): 73-77.
- [18] 王琨. 氨氮对鲤(*Cyprinus carpio*, Linnaeus)幼鱼部分组织及血液指标的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2007, 1-46.
- Wang Kun. Effects of ammonia on some tissue and haematological parameters of juvenile CARP (*Cyprinus carpio*, Linnaeus)[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2007, 1-46.
- [19] 吕晓燕. 亚硝酸盐和氨氮对红螯光壳螯虾生理生化的影响[D]. 上海: 华东师范大学, 2011, 1-76.
- Lv Xiaoyan. Effects on physiology and biochemistry of redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* under the nitrite and ammonia nitrogen stress[D]. Shanghai: East China Normal University, 2011, 1-76.
- [20] 王娟, 曲克明, 刘海英, 等. 不同溶氧条件下亚硝酸盐和氨氮对中国对虾的急性毒性效应[J]. 渔业科学进展, 2007, 28(6): 1-6.
- Wang Juan, Qu Keming, Liu Haiying, et al. Acute toxic effects of nitrite and non-ion ammonia on *Fenneropenaeus chinensis* at different dissolved oxygen levels[J]. Marine Fisheries Research, 2007, 28(6): 1-6.
- [21] 胡静, 周胜杰, 杨蕊, 等. 亚硝酸盐胁迫对尖吻鲈稚鱼抗氧化酶活性及皮质醇的影响[J]. 海洋科学, 2018, 42(4): 132-140.
- Hu Jing, Zhou Shengjie, Yang Rui, et al. Effect of acute nitrite on Antioxidant Enzymes and Cortisol in Juvenile *Lates calcarifer*[J]. Marine Science, 2018, 42(4): 132-140.
- [22] 李长玲, 黄翔鹄, 李瑞伟, 等. 硝化细菌对罗非鱼苗培育环境及抗病力的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2008, 28(6): 41-45.
- Li Changling, Huang Xianggu, Li Ruiwei, et al. Effects of nitrifying bacteria on culture environment and anti-disease ability of *Larval tilapia*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2008, 28(6): 41-45.
- [23] Young-Lai W, Charmantier M, Charmantier G. Effect of ammonia on survival and asmoregulation in different life stages of the lobster *Homarus americanus*[J]. Marine Biology, 1991, 110(2): 293-300.
- [24] Martínez-Álvarez R, Morales A, Sanz A. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors[J]. Reviews in Fish Biology Fisheries, 2005, 15(1/2): 75-88.
- [25] 张克烽, 张子平, 陈芸, 等. 动物的抗氧化系统中主要抗氧化酶基因的研究进展[J]. 动物学杂志, 2007, 42(2): 153-160.
- Zhang Kefeng, Zhang Ziping, Chen Yun, et al. Antioxidant defense system in animals[J]. Chinese Journal of Zoology, 2007, 42(2): 153-160.
- [26] Poelstra K, Bakker W W, Klok P A, et al. Dephosphorylation of endotoxin by alkaline phosphatase in vivo[J]. American Journal of Pathology, 1997, 151(4): 1163-1169.
- [27] 陈昌生, 王淑红, 纪德华, 等. 氨氮对九孔鲍过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活力的影响[J]. 上海水产大学学报, 2001, 10(3): 218-222.
- Chen Changsheng, Wang Shuhong, Ji Dehua, et al. Effects of ammonia-N on activities of CAT and SOD in *Haliotis diversicolor supertexta*[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2001, 10(3): 218-222.
- [28] 徐立红, 张甬元, 陈宜瑜. 分子生态毒理学研究进展及其在水环境保护中的意义[J]. 水生生物学报, 1995, 19(2): 171-185.
- Xu Lihong, Zhang Yongyuan, Chen Yiyu. The advances of molecular ecotoxicology and its significance in water environment protection[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1995, 19(2): 171-185.
- [29] 汪家鑫, 张钊, 胡盼, 等. 亚硝酸氮对红鳍东方鲀的毒性效应[J]. 广东海洋大学学报, 2013, 33(6): 52-56.
- Wang Jiaxin, Zhang Zhao, Hu Pan, et al. Effect of nitrite on hepatic antioxidant enzymes and acute toxicity in juvenile *Takifugu rubripes*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2013, 33(6): 52-56.
- [30] Martínez-Álvarez R M, Hidalgo M C, Domezain A, et al. Physiological changes of sturgeon *acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity[J]. Journal of Experimental Biology, 2002, 205(23): 3699-3706.
- [31] 吕晓燕, 李嘉尧, 方燕, 等. 亚硝酸盐对红螯光壳螯虾不同组织免疫相关酶活性及超微结构的影响[J]. 水产学报, 2010, 34(12): 1812-1820.
- Lü Xiaoyan, Li Jiayao, Fang Yan, et al. Nitrite stress on immune-related enzymes and the ultrastructure in different tissue of redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(12): 1812-1820.
- [32] 赵海涛. 氨氮对南方鲶(*Silurus meridionalis*, Chen)幼鱼血液生理、生化及非特异性免疫指标的影响[D]. 重庆: 西南大学, 2006.
- Zhao Haitao. Effects of ammonia on haematological and immune parameters of juvenile Southern catfish (*Silurus meridionalis*, Chen)[D]. Chongqing: Southwestern University, 2006.
- [33] 李波, 樊启学, 张磊, 等. 不同溶氧水平下氨氮和亚硝酸盐对黄颡鱼的急性毒性研究[J]. 淡水渔业, 2009, 39(3): 31-35.
- Li Bo, Fan Qixue, Zhang Lei, et al. Acute toxic effects of ammonia and nitrite on yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) at different dissolved oxygen levels[J]. Freshwater Fisheries, 2009, 39(3): 31-35.
- [34] 徐勇, 张修峰, 曲克明, 等. 不同溶氧条件下亚硝酸盐和氨氮对半滑舌鳎的急性毒性效应[J]. 海洋水产研究, 2006, 27(5): 28-33.

Xu Yong, Zhang Xiufeng, Qu Keming, et al. Acute toxic effects of nitrite and ammonia on *Cynoglossus*

semilaevis at different dissolve oxygen levels[J]. Marine Fisheries Research, 2006, 27(5): 28-33.

Effects of ammonia nitrogen stress on the activities of six immune enzymes of *Babylonia areolata*

TAN Chun-ming^{1, 2, 3}, ZHAO Wang^{1, 2, 3}, WU Kai-chang^{1, 2}, ZHANG Yue⁴, YANG Rui^{1, 3}, WEN Wei-geng^{1, 2, 3}, CHEN Xu^{1, 2, 3}, YU Gang^{1, 2}

(1. Tropical Aquaculture Research and Development Center of South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Sanya 572018, China; 2. Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization of Ministry of Agriculture, Guangzhou 510300, China; 3. Sanya Tropical Fisheries Research Institute, Sanya 572018, China; 4. College of Marine Science, Hainan University, Haikou 570228, China)

Received: Jan. 10, 2019

Key words: *Babylonia areolata*; ammonia nitrogen stress; immune enzymes

Abstract: This study investigated the acute toxicity of ammonia nitrogen and the effects of stress of different ammonia nitrogen concentrations (0, 22, 47.5, 102, and 220 mg/L) on the activities of the following six immune enzymes of *Babylonia areolata*: catalase (CAT), acid phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (AKP), total superoxide dismutase (T-SOD), glutathione peroxidase (GSH-PX), and peroxidase (POD). Results demonstrated that the higher the concentration of ammonia nitrogen, the stronger the toxicity and the higher the mortality of *B. areolata*. In the group treated with 500 mg/L ammonia nitrogen, there was $20.3\% \pm 2.1\%$ mortality at 24 h, and the survival rate decreased to 0% after culturing for 96 h. In addition, the mortality of *B. areolata* increased with the extension of the test duration. Regarding the enzyme activities, both the concentrations of ammonia nitrogen and the treatment duration had a significant effect on the activity of the immune enzymes of *B. areolata* ($P < 0.05$). Compared with the control groups, the activities of CAT and AKP exhibited a trend of “induction–suppression,” whereas those of ACP and T-SOD generally demonstrated a “suppression–induction” trend. However, with the extension of ammonia nitrogen treatment duration, the activity of GSH-PX exhibited a trend of “induction–suppression–induction.” Furthermore, treatment with ammonia nitrogen had an inhibitory effect on POD activity. These results imply that the ammonia nitrogen present in aquaculture water has a greater impact on the immunoenzyme activities of *B. areolata*. In this study, the combination of ecological phenomena and physiological indicators was applied to delineate the toxicity characteristics of ammonia nitrogen toward individual *B. areolata*, and the obtained results would imply a practical significance for the culture of *B. areolata*. In addition, these results would enrich the basic information about the effect of ammonia nitrogen on the immunity of shellfish in toxicology experiments, which can provide a knowledge and scientific basis that can be applied in ammonia nitrogen stress experiments on other shellfish.

(本文编辑: 赵卫红)