

氨氮急性攻毒对水产经济动物棘胸蛙(*Paa spinosa*) 蝌蚪死亡率、排氨率、耗氧率及窒息点的影响*

牛春格¹ 杨程² 申屠琰^{1,3} 郑晓静¹ 王志铮^{1①}

(1. 浙江海洋大学水产学院 舟山 316022; 2. 宁波市海洋与渔业研究院 宁波 315000; 3. 余姚市水产技术推广中心 余姚 315040)

摘要 以体长(1.932 ± 0.204)cm、体质量(1.386 ± 0.055)g 的棘胸蛙蝌蚪为实验动物,在水温(24 ± 0.2)°C、DO(7.30 ± 0.01)mg/L、pH 7.30 ± 0.01 条件下,采用静水停食法开展了氨氮对蝌蚪的急性攻毒实验,并以此为基础,测定了不同氨氮质量浓度胁迫下棘胸蛙蝌蚪的排氨率、耗氧率、氧氮比及窒息点。结果表明: (1) 蝌蚪对氨氮急性攻毒具明显的运动避毒行为,濒死个体的背部皮肤和肝脏均具明显的色变症状; (2) 氨氮对蝌蚪的急性致死率具明显的剂量—时间效应, 24h、48h、72h、96h LC₅₀ 依次为 177.5、151.7、148.6 和 146.8mg/L, 毒性时段蓄积程度系数呈持续下降趋势, 24—48h、48—72h、72—96h 的时段 MAC 值分别为 84.04%、10.1%和 5.86%; (3) 蝌蚪夜均、昼均、日均及时段排氨率随氨氮质量浓度增加均呈阶梯式下降趋势, 其中时段排氨率与对照组均无显著差异的为 9.80mg/L 实验组, 夜均、昼均、日均及时段排氨率与对照组均无显著差异的仅为 2.45mg/L 实验组($P>0.05$); (4) 氨氮对蝌蚪呼吸耗氧具低毒兴奋效应, 其夜均、昼均和日均耗氧率随氨氮质量浓度增加均呈先升后降趋势, 峰值氨氮质量浓度范围均为 4.90—7.35mg/L ($P<0.05$), 与对照组均无显著差异的仅为 14.70mg/L 实验组($P>0.05$), 窒息点含氧量随氨氮质量浓度增加呈先降后升趋势, 谷底出现于 4.90mg/L 实验组($P<0.05$), 与对照组无显著差异的仅为 9.80mg/L 实验组($P>0.05$); (5) 实验期间, 蝌蚪氧氮比(O:N)波动于 18.87—25.34 之间, 昼均和日均氧氮比(O:N)随氨氮质量浓度增加均依次呈“上升—稳定—下降—再稳定”之趋势, 两者的峰值氨氮质量浓度范围分别为 4.90—14.70mg/L 和 4.90—9.80mg/L, 夜均氧氮比(O:N)呈先升后降趋势, 峰值出现于 7.35mg/L 实验组($P<0.05$)。

关键词 棘胸蛙蝌蚪; 氨氮; 急性毒性; 排氨率; 耗氧率; 氧氮比(O:N); 窒息点

中图分类号 S966.3 **doi:** 10.11693/hyhz20180500109

棘胸蛙(*Paa spinosa*)系广泛分布于我国南方丘陵山区的特有大型名贵食用蛙,属对生存环境相对湿度要求很高的山溪型蛙种,尤以变态初期的幼蛙为甚。受此限制,目前棘胸蛙养殖场均建于溪流长年较为充沛的山区,以模拟栖息地自然条件开展人工流水养殖。由此,破解棘胸蛙平原集约化养殖技术壁垒,以打破区域限制,扩大养殖规模,增进养殖产能与效益,切实满足棘胸蛙平民化消费的需求,已成为促进

该蛙人工养殖转型升级和提质增效的重要途径。针对棘胸蛙蝌蚪生长周期长,养殖密度高,变态能耗大,以及饲喂后淀粉类残饵极易在水中腐败变质的实际,探究该蛙蝌蚪人工养殖所需的适宜生态环境条件,进而构建相应的养殖水质保障技术体系,已成为当前实施该蛙蝌蚪平原集约化养殖面临的重要产业命题之一。氨氮既是评价水体富营养化程度的重要理化指标,也是水产养殖生产过程中必检的水质指标(中

*余姚市与浙江海洋学院市院合作项目: 棘胸蛙集约化高效养殖关键技术集成与综合示范, 2013—2016。牛春格, 硕士研究生, E-mail: 897448237@qq.com

通信作者: 王志铮, 教授, 研究员, E-mail: wzz_1225@163.com

收稿日期: 2018-05-08, 收修改稿日期: 2018-06-11

华人民共和国农业部, 2001)。因此, 探析该蛙蝌蚪对氨氮的耐受性能, 以及氨氮对该蛙蝌蚪的毒害过程与机制, 无疑对于指导该蛙蝌蚪集约化安全养殖具有重要应用价值和现实意义。但目前国内外有关该蛙蝌蚪对水质理化因子的耐受与响应特征研究, 仅涉及水温对其表型特征(陈雯等, 2010)、生长发育与变态(章海鑫等, 2014; 赵蒙蒙等, 2014; 陶志英等, 2015)以及生理生态(杨程等, 2016; 朱卫东等, 2016; 黄贞胜, 2016)等的影响, 而有关氨氮对该蛙蝌蚪急性致毒效应的研究则迄今尚未见报道。鉴于此, 本文作者参考王志铮等(2013)和邹李昶等(2015)的研究方法, 以氨氮对该蛙蝌蚪的急性毒性研究为基础, 通过进一步探析氨氮对其机体能量代谢的影响特征, 较精确地定义了其氨氮安全质量浓度范围, 以期为该蛙蝌蚪的科学养殖和环境污染事故的侦查与评估提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验用水 试验水源为经 48h 自然曝气的自来水, 水温(24 ± 0.2) $^{\circ}\text{C}$ 、DO (7.30 ± 0.01)mg/L、pH 7.30 ± 0.01 , 水质完全符合《NY 5051-2001 无公害食品淡水养殖用水水质》(中华人民共和国农业部, 2001)要求。实验时, 用 NH_4Cl (AR 级, 国药集团化学试剂有限公司出品)配置相应氨氮质量浓度的试验用水, 现配现用。

1.1.2 供试蝌蚪 系购自浙江省余姚市陆埠镇石门村下鲁石蛙养殖场的同生群个体。运至浙江海洋大学水产安全养殖实验室后, 即刻停食暂养于若干规格为 $80\text{cm}\times 50\text{cm}\times 42\text{cm}$ 的白色塑料箱(实际容积 75L)内, 暂养期间及时捞除死亡个体, 日换水 1 次, 换水率为 100%。经为期 2d 暂养, 彻底排空体内粪便后, 选取其中肢体完整、体色相近、反应灵敏、游动活泼的健康个体作为供试对象, 具体规格为体长(1.932 ± 0.204)cm、体质量(1.386 ± 0.055)g。

1.2 实验方法

1.2.1 氨氮对蝌蚪的急性攻毒实验 经预实验, 获取氨氮质量浓度实验范围后, 按等差间距依次设置 100、120、140、160、180、200、220、240mg/L 等 8 个实验梯度, 以白色平底塑料园盆为实验容器单元(直径 32cm, 实验实际容积为 4L), 于静水停食条件下开展氨氮对蝌蚪的急性攻毒实验, 每个实验梯度均设 3 个重复, 每个实验容器单元内各放供试蝌蚪

12ind.。实验期间, 以蝌蚪沉入实验容器底部, 并用玻璃棒反复触碰无任何反应作为死亡评判标准, 连续观察供试蝌蚪活动情况, 及时捞除并解剖死亡个体, 每 24h 更换 1 次实验液(换液率为 100%)并统计累计死亡率。

1.2.2 氨氮急性攻毒对蝌蚪排氮率、耗氧率和窒息点的影响实验 根据上述氨氮对蝌蚪急性攻毒实验所得结果, 应用 $\text{SC}=0.1\times 96\text{h LC}_{50}$ (Sprague, 1971)获取氨氮安全质量浓度估算值 14.7mg/L 后, 按等差间距依次设置 0(对照组)、2.45、4.90、7.35、9.80、12.25、14.70、17.15、19.60mg/L 等 9 个实验梯度, 以液体石蜡(AR 级, 国药集团化学试剂有限公司出品)作为呼吸室绝氧材料, 在绝氧层厚度均为 1cm, 实验起始时刻均为凌晨 2:00 条件下开展氨氮急性攻毒对蝌蚪排氮率、耗氧率和窒息点的影响实验, 供试蝌蚪均于对应氨氮质量浓度的呼吸室内适应 2h 后开始实验。实验期间, 水样溶解氧和氨氮质量浓度测定方法完全同朱卫东等(2016)。

排氮率和耗氧率测定, 均以刻度为 1000mL 的锥形瓶为呼吸室(实验实际容积 800mL), 每一实验梯度均设 3 个重复, 每个重复各放蝌蚪 10ind., 以 24h 为实验周期, 每隔 4h 用移液管自呼吸室底部吸取 15mL 水样, 并测定其溶解氧和氨氮质量浓度。实验结束时刻, 用定性滤纸吸净供试蝌蚪体表水分后, 用 FA1004 型电子天平(上海舜宇横平科学仪器有限公司生产, 精度为 0.1mg)逐一称量各呼吸室内供试蝌蚪的总质量, 并计算蝌蚪的排氮率(NR)、耗氧率(OR)和氧氮比(O:N)。

窒息点测定, 以刻度为 250mL 的锥形瓶(实验实际容积 100mL)为呼吸室, 每一实验梯度均设 3 个重复, 每个重复各放入供试蝌蚪 6ind., 窒息点的定义为供试蝌蚪死亡 50%时呼吸室水中的溶解氧含量。

1.3 数据处理

根据氨氮对蝌蚪急性攻毒实验所获数据, 借助 SPSS17.0 软件建立不同观察时段累计死亡概率单位(y)与氨氮质量浓度(x)间的直线回归方程, 并在分别计算蝌蚪 24h、48h、72h、96h LC_{50} 值的基础上, 采用药物毒性蓄积程度系数 MAC(王志铮等, 2007)来分析实验蝌蚪对氨氮的蓄积与降减动态。昼夜间蝌蚪排氮率、耗氧率的统计时段分别为 6:00—18:00 和 18:00 至翌日 6:00, 排氮率、耗氧率、氧氮比和窒息点组间差异的显著性检验均采用 LSD 多重比较法($P<0.05$ 为显著水平, $P<0.01$ 为极显著水平)。

2 结果

2.1 中毒症状

观察发现,实验初期供试蝌蚪游动速率有随氨氮攻毒质量浓度增加而显著提高的迹象,表现出较为明显的运动避毒行为特征。随攻毒实验的延续,供试蝌蚪的运动避毒行为能力亦有随氨氮攻毒质量浓度的提高而呈明显下降的趋势。随中毒程度提高,供试蝌蚪运动能力逐渐丧失,背部体表肤色也渐由正常状态的黑灰色转为灰白色,尤以尾部皮肤变化最为明显,并陆续沉入实验容器底部直至表露死亡。解剖濒死蝌蚪,可明显见其肝脏由正常状态的暗红色转为中毒后的乳黄色。综上可知,氨氮中毒可引起供试蝌蚪运动能力的丧失,以及背部体表皮肤和肝脏的色变。

2.2 死亡率

由图 1 可见,虽供试蝌蚪的累计死亡率均随氨氮质量浓度增加和攻毒时间延长而提高,但其致死率陡度总体上却均有随氨氮质量浓度增加和攻毒时间延长而呈逐渐下降的趋势,主要表现为同一氨氮质量浓度实验组内,以及不同氨氮质量浓度实验组间攻毒 0—48h 时段内的蝌蚪死亡率陡度均明显大于 48—96h 时段,表明 48h 为本研究所设氨氮实验质量浓度范围内,蝌蚪累计致死率陡度明显下降的分水岭。

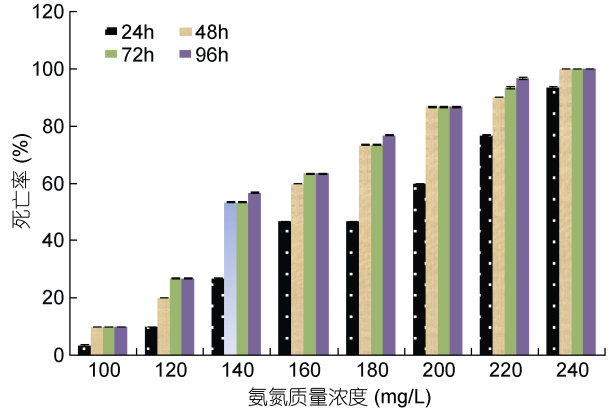


图 1 氨氮急性攻毒下棘胸蛙蝌蚪的死亡率

Fig.1 The mortality of *P. spinosa* tadpoles under acute toxicity attack of ammonia

整理图 1 所示数据得表 1。由表 1 可见,氨氮对蝌蚪的急性毒性具明显的剂量-时间效应,其 24h、48h、72h、96h 的 LC_{50} 分别为 177.5、151.7、148.6 和 146.8mg/L;采用 $SC=0.1\times 96h LC_{50}$ (Sprague, 1971) 估算其氨氮安全质量浓度,估值为 14.7mg/L;经计算,其 24—48h、48—72h、72—96h 时段的毒物蓄积程度系数(MAC)依次为 84.04%、10.1%和 5.86%,均为正值,表明实验期间供试蝌蚪虽一直处于以毒效蓄积为主导的氨氮急性攻毒状态,但其死亡高峰却出现于氨氮攻毒 48h 内。

表 1 氨氮对棘胸蛙蝌蚪的急性致毒特征

Tab.1 The feature of ammonia acute toxicity to the *P. spinosa* tadpoles

时间(h)	死亡概率单位-质量浓度 回归方程	R^2	df	F	Sig	LC_{50} 值及 95%置信区间 (mg/L)	MAC(%)
24	$y=0.0211x+1.2556$	0.9671	7	176.24	0.000	177.5(175.5—179.5)	—
48	$y=0.0219x+1.6772$	0.9739	7	223.96	0.000	151.7 (149.7—153.7)	84.04
72	$y=0.0219x+1.7458$	0.9832	7	352.11	0.000	148.6(146.6—150.6)	10.1
96	$y=0.0225x+1.6977$	0.9785	7	273.16	0.000	146.8(144.7—148.9)	5.86

2.3 排氨率

由图 2 可见,氨氮急性胁迫下蝌蚪的时段及昼夜排氨率变动特征主要表现为:(1)蝌蚪昼均、夜均、日均及各时段排氨率均有随氨氮质量浓度增加呈阶梯式稳步下降的趋势,其中时段排氨率与对照组均无显著差异($P>0.05$)的氨氮质量浓度上限为 9.80mg/L,而与对照组昼均、夜均和日均排氨率均无显著差异的则仅为氨氮质量浓度 2.45mg/L 实验组($P>0.05$);(2)各实验组的排氨率均呈夜均>日均>昼均($P<0.05$),且时段排氨率均以 22:00—翌日 2:00 为最大($P<0.05$),2:00—6:00 和 14:00—18:00 时段为最小($P<0.05$)。综

上可知,尽管本研究所涉各实验组的排氨时段节律和昼夜节律均未因氨氮急性胁迫而发生根本性改变,但蝌蚪表露正常排氨的氨氮质量浓度临界范围则仅为 2.45—9.80mg/L,表明氨氮对蝌蚪排氨率具较明显的剂量抑制效应。

2.4 耗氧率

由图 3 可见,氨氮急性胁迫下蝌蚪的时段及昼夜耗氧率变动特征主要表现为:(1)随氨氮质量浓度增加,蝌蚪昼均、夜均、日均及除 14:00—18:00 以外的各时段耗氧率均呈“上升—稳定—下降”的变动特征,且其峰值氨氮质量浓度范围均为 4.90—7.35mg/L,与

对照组昼均、夜均和日均耗氧率无显著差异的仅为 14.70mg/L 实验组($P>0.05$), 且该实验组除 6:00—10:00 以外的各时段耗氧率也均与对照组无显著差异($P>0.05$); (2) 各实验组耗氧率均呈夜均>日均>昼均($P<0.05$), 且其时段耗氧率均以 22:00—翌日 2:00 为最大($P<0.05$), 2:00—6:00 为最小($P<0.05$)。综上可知, 尽管本研究所

涉各实验组的耗氧时段节律和昼夜节律均未因氨氮急性胁迫而发生根本性改变, 但蝌蚪表露正常耗氧率的临界氨氮质量浓度为 14.70mg/L, 且氨氮质量浓度 2.45—12.25mg/L 范围内昼均、夜均和日均耗氧率均显著大于对照组($P>0.05$)的结果(图 3), 表明氨氮对蝌蚪耗氧率具较为明显的低毒兴奋效应。

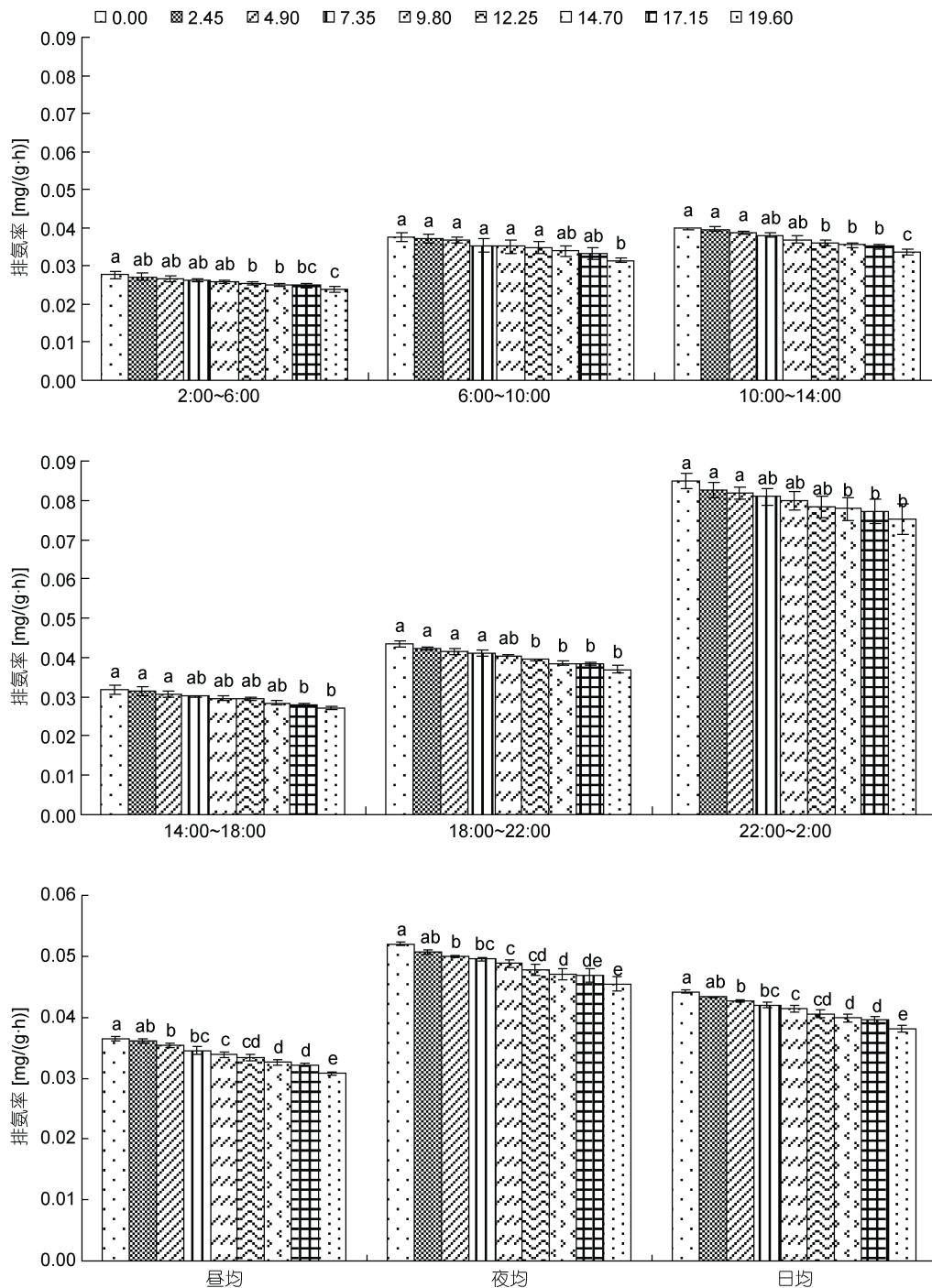


图 2 氨氮急性攻毒对棘胸蛙蝌蚪昼夜排氨节律的影响特征

Fig.2 The feature of acute effects of ammonia toxicity attack on the circadian rhythm of day and night ammonia excretion of *P. spinosa* tadpoles

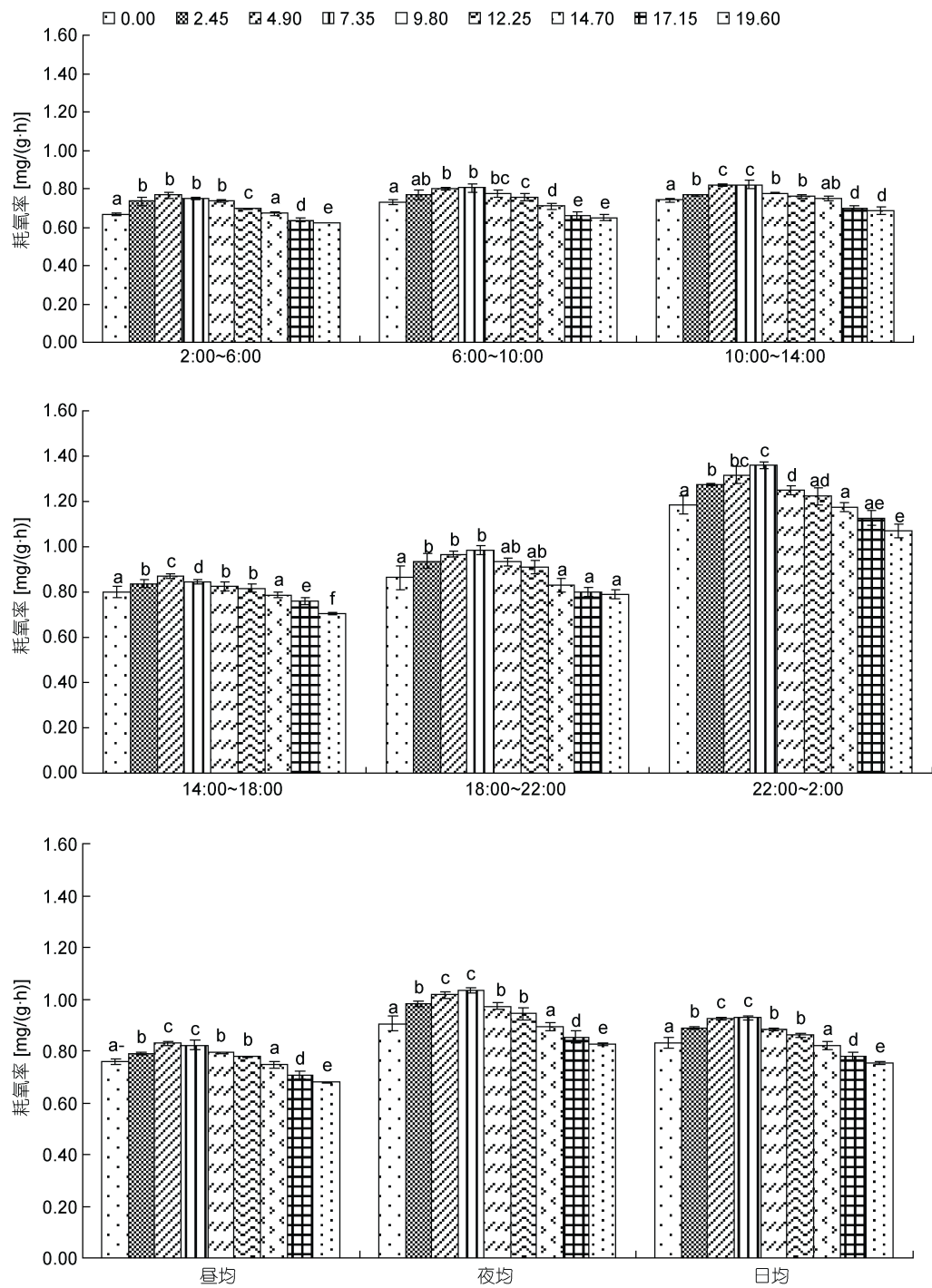


图 3 氨氮急性攻毒对棘胸蛙蝌蚪昼夜耗氧节律的影响特征

Fig.3 The feature of acute effects of ammonia toxicity attack on the circadian rhythm of day and night oxygen consumption of *P. spinosa* tadpoles

2.5 窒息点

由图 4 可见, 供试蝌蚪窒息点含氧量随氨氮质量浓度增加呈明显的先降后升趋势, 并分别于氨氮质量浓度 4.90mg/L 时达到谷低($P<0.05$), 9.80mg/L 时与

对照组持平($P>0.05$), 氨氮质量浓度 12.25、14.70、17.15 和 19.60mg/L 实验组的窒息点含氧量分别为对照组的 1.17、1.35、1.53 和 1.64 倍, 且均显著大于对照组($P<0.05$), 表明蝌蚪耐低氧能力以氨氮质量浓度

4.90mg/L 实验组为最强, 表露正常耐低氧能力的临界氨氮质量浓度为 9.80mg/L, 即氨氮对蝌蚪耐低氧

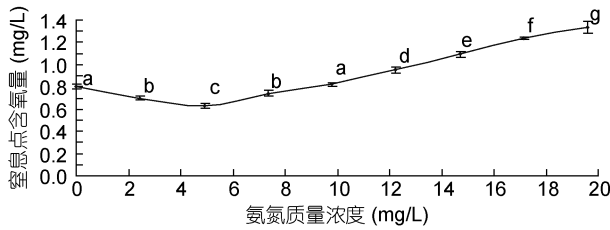


图4 氨氮急性攻毒对棘胸蛙蝌蚪窒息点的影响

Fig.4 The acute effects of ammonia toxicity attack on suffocation point of *P. spinosa* tadpoles

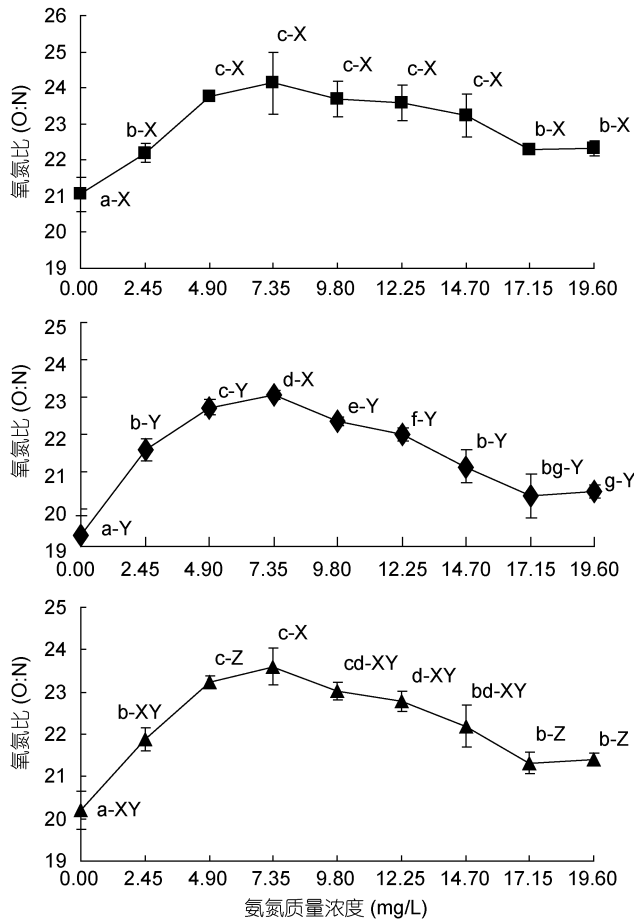


图5 氨氮急性攻毒对棘胸蛙氧氮比昼夜节律的影响

Fig.5 The acute effects of ammonia toxicity attack on circadian rhythm of day and night oxygen to nitrogen ratio of *P. spinosa* tadpoles

注: ■昼均(6:00—18:00), ◆夜均(18:00—翌日 6:00), ▲日均

能力具明显的低毒兴奋效应。

2.6 氧氮比(O:N)

计算图2和图3所得结果得图5。由图5可见, 实验期间供试蝌蚪的氧氮比(O:N)波动范围为 18.87—25.34, 其变动特征主要表现为: (1) 蝌蚪昼

均、夜均及日均氧氮比(O:N)均以对照组为最低 ($P<0.05$); (2) 蝌蚪昼均和日均氧氮比(O:N)随氨氮质量浓度增加均呈“上升—稳定—下降—再稳定”之趋势, 峰值氨氮质量浓度范围分别为 4.90—14.70mg/L 和 4.90—9.80mg/L, 夜均氧氮比(O:N)呈先升后降趋势, 峰值氨氮质量浓度为 7.35mg/L ($P<0.05$); (3) 除 7.35mg/L 实验组氧氮比(O:N)无昼夜差异 ($P>0.05$) 外, 其余实验组均呈夜均>昼均 ($P<0.05$), 其中日均与夜均、昼均氧氮比(O:N)均具显著差异的仅为 4.90、17.15 和 19.60mg/L 实验组。

3 讨论

3.1 棘胸蛙蝌蚪的耐氨策略及其局限性

氨氮是两栖类蝌蚪和大多数鱼类的氨基酸代谢产物。因此, 两栖类蝌蚪和大多数鱼类可通过显著降低体内氨基酸代谢水平, 以有效规避源自体内外的氨毒影响。据报道, 当水环境氨氮处于较高水平时, 鱼类为应对氨毒侵害, 往往会采取降低自身产氮量, 以保持机体内稳态机制的耐氨策略(Lim *et al*, 2001; Ip *et al*, 2004a, b)。氧氮比(O:N)作为反映机体代谢底物利用状况的重要生理指标(Ikeda, 1974; Mayzaud, 1976; Buttle *et al*, 1996), 无疑可帮助我们通过分析目标动物受氨氮攻毒下蛋白质水解和氨基酸代谢水平的变化特征, 进而揭示其是否具有上述耐氨策略的可能性。按 Mayzaud 等(1988)根据 O:N 值确定代谢底物种类组成和比例划分的标准, 本研究所涉各实验组的昼均、夜均和日均 O:N 值均介于 16—50 之间, 且对照组昼均、夜均和日均氧氮比(O:N)均显著低于其它实验组的结果(图 5), 既表明氨氮攻毒并未能改变棘胸蛙蝌蚪代谢底物以蛋白质为主的特征, 也揭示了棘胸蛙蝌蚪在氨氮攻毒下确实存在通过增强脂肪动员, 抑制蛋白质水解和氨基酸代谢水平, 主动减少体内产氮量, 以有效稀释血氨浓度, 尽可能规避氨毒影响的耐氨策略。与此同时, 本研究中棘胸蛙蝌蚪排氮率随氨氮攻毒质量浓度上升呈阶梯式下降的结果(图 2), 与泥鳅、黄鳝受氨氮胁迫下体组织中氨蓄积量明显高于氨排泄量的情形(Chew *et al*, 2001, 2005; Tsui *et al*, 2002; Tay *et al*, 2003)类似, 均印证了张云龙等(2017)认为上述耐氨策略仅当体内氨氮的蓄积速率明显大于排泄速率时才会启动的观点。当然, 本研究中棘胸蛙蝌蚪表露正常排氮和耗氧的临界氨氮质量浓度均为 14.70mg/L (图 2, 图 3), 以及昼均、夜均和日均 O:N 值随氨氮攻毒质量浓度增加均呈先升后

降(图 5)的结果,则进一步表明上述耐氨策略具较为明显的局限性,即过高的氨氮攻毒质量浓度将明显影响上述耐氨策略的实施效率。蝌蚪变态发育需要充足的能量储备,故氨氮亚慢性胁迫下虎纹蛙蝌蚪变态发育时长随氨氮攻毒质量浓度升高而显著延长的现象(黄艳, 2015),无疑较直观地注释了这种以增加脂肪消耗为代价的耐氨策略,必将会影响进而干扰蝌蚪正常发育进程的事实。另, MAC 值所示棘胸蛙蝌蚪氨氮蓄积高峰时段为 24—48h(表 1)的结果,也指示我们在棘胸蛙蝌蚪养殖过程中应密切关注水体中氨氮质量浓度的变化。

肝脏作为脊椎动物的能量代谢中枢、解毒中心和氧气消耗的主要器官(Otto *et al.*, 1996),代谢底物中脂肪含量占比的增加,势必导致肝脏需氧量的明显上升。研究表明,皮肤是无尾类蝌蚪的主要供氧器官,其供氧贡献率约占机体总耗氧量的 60%(Burggren *et al.*, 1982);蝌蚪受低氧胁迫时,往往会呈现皮肤变薄、毛细血管增多,并产生水—血屏障的变化特征(Burggren *et al.*, 1983; Jia *et al.*, 1997)。故,本研究中棘胸蛙蝌蚪耗氧率和窒息点含氧量随氨氮攻毒质量浓度增加分别呈先升后降和先降后升趋势的结果(图 3, 图 4),既表明低质量浓度的氨氮可借助上述耐氨策略,通过扩张皮肤毛细血管网,大幅提升皮肤供氧效率,显著提高供试蝌蚪的耐低氧能力和肝脏的脂肪氧化代谢水平,表现出较为明显的低毒兴奋效应,也揭示了高质量浓度的氨氮会导致蝌蚪陷入皮肤供氧效率与肝脏脂肪氧化代谢水平同步下降的“由表及里”和“表里互通”的恶性循环之中,从而使上述耐氨策略的实施效果大打折扣。无疑,本研究急性攻毒实验观察所示的蝌蚪背部皮肤和肝脏色变中毒症状,系皮肤供氧能力和肝脏解毒作用不堪承受上述恶性循环导致的结果。据此,可推定蝌蚪皮肤和肝脏为氨氮攻毒的主要靶器官。

3.2 关于棘胸蛙蝌蚪耐氨能力及其安全质量浓度的探讨

96h LC_{50} 是评价水生动物耐毒能力强弱的重要指标。据报道,以泥鳅、大鳞副泥鳅、黄鳝为代表的呼吸型鱼类较其他鱼类往往具更强的耐氨毒能力(Ip *et al.*, 2004b; 郝小凤等, 2012; 张云龙等, 2017)。棘胸蛙蝌蚪和虎斑蛙蝌蚪均以皮肤呼吸为主导,两者的氨氮 96h LC_{50} 值分别为 146.8mg/L (表 1)和 151.15mg/L (黄艳, 2015),均与泥鳅的氨氮 96h LC_{50} 值 164.41mg/L (郝小凤等, 2012)相近,表明供氧方式

的多元化更有助于呼吸型水生动物在氨氮急性胁迫下通过及时调整代谢底物组成比例,降低氨基酸代谢水平,从而达到有效提升耐氨能力的目的。这就为我们从棘胸蛙蝌蚪耗氧率和窒息点的变化特征来精准评价其氨氮安全质量浓度提供了有力的证据支持。

由图 3、图 4 所示,棘胸蛙蝌蚪对氨氮的低毒兴奋效应,及其耗氧率和窒息点的氨氮质量浓度安全临界上限分别为 14.70mg/L 和 9.80mg/L 的结果,表明棘胸蛙蝌蚪的耐低氧能力较肝脏脂肪氧化代谢水平在表征耐氨毒敏感性上具更为重要的生理生态重要性,即棘胸蛙蝌蚪窒息点低毒兴奋效应的终止,将预示着其皮肤供氧效率因不堪肝脏脂肪氧化代谢需氧量的进一步增大而出现逆转。邹李昶等(2015)等认为,因 96h LC_{50} 值具相应的置信区间,故借助 $SC=0.1 \times 96h LC_{50}$ (Sprague, 1971)估算所得的 SC 值也应具上、下限。鉴于氨氮急性攻毒实验所得的棘胸蛙蝌蚪安全质量浓度估算值,与氨氮急性胁迫下棘胸蛙蝌蚪的耗氧率安全临界上限均为 14.70mg/L 的结果(表 1, 图 3),本研究将氨氮质量浓度 14.70mg/L 设为棘胸蛙蝌蚪耐受氨氮急性胁迫的安全质量浓度上限,而将氨氮急性胁迫下棘胸蛙蝌蚪窒息点的安全临界上限 9.80mg/L,定义为棘胸蛙蝌蚪耐受氨氮急性胁迫的安全质量浓度下限。

4 结论

棘胸蛙蝌蚪皮肤和肝脏是氨氮攻毒的主要靶器官。氨氮对棘胸蛙蝌蚪的急性毒性作用具明显的剂量-时间效应,其毒性时段蓄积程度系数 MAC 值以 24—48h 时段为最大。

棘胸蛙蝌蚪对氨氮急性攻毒具较为明显运动避毒特征。氨氮对棘胸蛙蝌蚪的排氨率具较明显的剂量抑制效应,对耗氧率和窒息点则均具较为明显的低毒兴奋效应。

受氨氮急性攻毒,棘胸蛙蝌蚪具有通过增强脂肪动员,抑制蛋白质水解和氨基酸代谢水平,主动减少体内产氨量,以尽可能规避氨毒影响的耐氨策略。

在水温(24±0.2)°C、DO(7.30±0.01)mg/L、pH 7.30±0.01 条件下,棘胸蛙蝌蚪[体长(1.932±0.204)cm,体质量(1.386±0.055)g]的氨氮 96h LC_{50} 值为 146.8mg/L,其表露正常排氨和耗氧的临界氨氮质量浓度均为 14.70mg/L,表露正常耐低氧能力的临界氨氮质量浓度为 9.80mg/L。经分析,认定其氨氮安全质量浓度范围为 9.80—14.70mg/L。

参 考 文 献

- 中华人民共和国农业部, 2001. NY 5051—2001 无公害食品淡水养殖用水水质. 北京: 中国农业出版社, 1—5
- 王志铮, 申屠琰, 熊 威, 2007. 4 种消毒剂对麦瑞加拉鲮鱼幼鱼的急性毒性研究. 海洋水产研究, 28(3): 92—97
- 王志铮, 任凤艺, 赵 晶等, 2013. Zn^{2+} 对日本沼虾 (*Macrobrachium nipponensis*) 的急性致毒效应. 海洋与湖沼, 44(1): 235—240
- 朱卫东, 任凤艺, 申屠琰等, 2016. 水温对棘胸蛙(*Paa spinosa*)蝌蚪行为及尾部皮肤和肝脏相关功能酶活力的影响. 海洋与湖沼, 47(1): 245—252
- 张云龙, 张海龙, 王凌宇等, 2017. 氨氮对鱼类毒性的影响因子及气呼吸型鱼类耐氨策略. 水生生物学报, 41(5): 1157—1168
- 杨 程, 刘哲宇, 朱卫东等, 2016. 水温对水产经济动物棘胸蛙(*Paa spinosa*)蝌蚪耗氧率、窒息点和排氨率的影响. 海洋与湖沼, 47(6): 1233—1240
- 邹李昶, 任凤艺, 王志铮等, 2015. 氨氮急性胁迫对日本沼虾 (*Macrobrachium nipponensis*) 死亡率、耗氧率及窒息点的影响. 海洋与湖沼, 46(1): 206—211
- 陈 雯, 俞宝根, 郑荣泉等, 2010. 温度对棘胸蛙胚胎发育及蝌蚪表型特征的影响. 贵州农业科学, 38(1): 108—110
- 赵蒙蒙, 郑荣泉, 宋婷婷等, 2014. 饲料营养水平和温度对棘胸蛙蝌蚪变态发育的影响. 广东农业科学, 41(20): 119—122
- 郝小凤, 刘 洋, 凌去非, 2012. 氨氮对泥鳅的急性毒性及其肝、鳃组织超微结构的影响. 水生态学杂志, 33(5): 101—107
- 陶志英, 马保新, 余智杰等, 2015. 环境因子对棘胸蛙蝌蚪生长发育的影响. 湖南农业科学, (2): 55—56, 59
- 章海鑫, 余智杰, 马保新等, 2014. 不同饲养环境因子水平对棘胸蛙蝌蚪变态的影响. 贵州农业科学, 42(12): 180—182
- 黄 艳, 2015. 氨氮胁迫对虎纹蛙蝌蚪及成体的毒性研究. 金华: 浙江师范大学硕士学位论文, 12—24
- 黄贞胜, 2016. 高温胁迫对棘胸蛙蝌蚪抗氧化酶活力的影响. 渔业研究, 38(6): 445—452
- Burggren W, Mwalukoma A, 1983. Respiration during chronic hypoxia and hyperoxia in larval and adult bullfrogs (*Rana catesbeiana*) I. Morphological responses of lungs, skin and gills. Journal of Experimental Biology, 105(1): 191—203
- Burggren W W, West N H, 1982. Changing respiratory importance of gills, lungs and skin during metamorphosis in the bullfrog *Rana catesbeiana*. Respiratory Physiology, 47(2): 151—164
- Buttle L G, Uglow R F, Cowx I G, 1996. The effect of emersion and handling on the nitrogen excretion rates of *Clarias gariepinus*. Journal of Fish Biology, 49(4): 693—701
- Chew S F, Gan J, Ip Y K, 2005. Nitrogen metabolism and excretion in the swamp eel, *Monopterus albus*, during 6 or 40 days of estivation in mud. Physiological and Biochemical Zoology, 78(4): 620—629
- Chew S F, Jin Y, Ip Y K, 2001. The loach *Misgurnus anguillicaudatus* reduces amino acid catabolism and accumulates alanine and glutamine during aerial exposure. Physiological and Biochemical Zoology, 74(2): 226—237
- Lim C B, Chew S F, Anderson P M *et al*, 2001. Reduction in the rates of protein and amino acid catabolism to slow down the accumulation of endogenous ammonia: A strategy potentially adopted by mudskippers (*Periophthalmodon schlosseri* and *Boleophthalmus boddarti*) during aerial exposure in constant darkness. Journal of Experimental Biology, 204(9): 1605—1614
- Ikeda T, 1974. Nutritional ecology of marine zooplankton. Memoirs of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University, 22(1): 1—97
- Ip Y K, Lim C K, Lee S M L *et al*, 2004a. Postprandial increases in nitrogenous excretion and urea synthesis in the giant mudskipper *Periophthalmodon schlosseri*. Journal of Experimental Biology, 207(17): 3015—3023
- Ip Y K, Tay A S L, Lee K H *et al*, 2004b. Strategies for surviving high concentrations of environmental ammonia in the swamp eel *Monopterus albus*. Physiological and Biochemical Zoology, 77(3): 390—405
- Jia X X, Burggren W W, 1997. Developmental Changes in chemoreceptive control of gill ventilation in larval bullfrogs (*Rana catesbeiana*) I. Reflex ventilatory responses to ambient hyperoxia, hypoxia and NaCN. Journal of Experimental Biology, 200(16): 2229—2236
- Mayzaud P, 1976. Respiration and nitrogen excretion of zooplankton. IV. The influence of starvation on the metabolism and the biochemical composition of some species. Marine Biology, 37(1): 47—58
- Mayzaud P, Conover R J, 1988. O:N atomic ratio as a tool to describe zooplankton metabolism. Marine Ecology Progress Series, 45(3): 289—302
- Otto D M E, Moon T W, 1996. Endogenous antioxidant systems of two teleost fish, the rainbow trout and the black bullhead, and the effect of age. Fish Physiology and Biochemistry, 15(4): 349—358
- Sprague J B, 1971. Measurement of pollutant toxicity to fish—III. Sublethal effects and “safe” concentrations. Water Research, 5(6): 245—266
- Tay A S L, Chew S F, Ip Y K, 2003. The swamp eel *Monopterus albus* reduces endogenous ammonia production and detoxifies ammonia to glutamine during 144h of aerial exposure. Journal of Experimental Biology, 206(14): 2473—2486
- Tsui T K N, Randall D J, Chew S F *et al*, 2002. Accumulation of ammonia in the body and NH_3 volatilization from alkaline regions of the body surface during ammonia loading and exposure to air in the weather loach *Misgurnus anguillicaudatus*. Journal of Experimental Biology, 205(5): 651—659

ACUTE EFFECT OF AMMONIA TOXICITY ATTACK ON MORTALITY, AMMONIA EXCRETION RATE, OXYGEN CONSUMPTION AND SUFFOCATION POINT ON *PAA SPINOSA* TADPOLES IN AQUATIC ECONOMY

NIU Chun-Ge¹, YANG Cheng², SHEN Tu-Yan^{1,3}, ZHENG Xiao-Jing¹, WANG Zhi-Zheng¹

(1. Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China; 2. Ningbo Marine and Fisheries Research Institute, Ningbo 315000, China; 3. Yuyao Aquatic Technology extension Center, Yuyao 315040, China)

Abstract The *Paa spinosa* tadpoles with a length of 1.932 ± 0.204 cm and body weight of 1.386 ± 0.055 g were used as experimental animals. Under the condition of water temperature of 24 ± 0.2 °C, DO 7.30 ± 0.01 mg/L and pH 7.30 ± 0.01 , the acute effect of ammonia toxicity attack on tadpoles was carried out with the method of static water without feeding and the basis of this condition to determine the ammonia excretion rate, oxygen consumption, the proportion of oxygen and nitrogen and suffocation point of *Paa spinosa* tadpoles under different ammonia concentration exposure. The results shows that (1) tadpoles had obvious exercise avoidance behavior for against acute attack of ammonia, so the back skin and liver of the dying individual have obvious symptom of chromosis; (2) tadpoles have significant dose-time effect of ammonia nitrogen on acute mortality, 24h, 48h, 72h and 96h LC_{50} were 177.5, 151.7, 148.6 and 146.8 mg/L in succession. The cumulative degree coefficient of toxic time showed a downward trend, and the value of MAC in the time frame 24—48h, 48—72h and 72—96h were 84.04%, 10.1% and 5.86% respectively. (3) The rate of ammonia excretion of the tadpoles decreased step by step with the increase of ammonia concentration in average night. There was no significant difference in ammonia excretion rate between 9.80 mg/L experimental group and control group and there was no significant difference in night average, day average, daily average and period ammonia excretion rate between 2.45 mg/L experimental group and control group ($P > 0.05$). (4) The effect of ammonia nitrogen on respiration and oxygen consumption of tadpoles was low. The rate of oxygen consumption at night, day and day increased first and then decreased with the increase of ammonia concentration. The range of the peak concentration of ammonia nitrogen was 4.90—7.35 mg/L ($P < 0.05$), but there was no significant difference between the 14.70 mg/L group and the control group ($P > 0.05$). The oxygen content in the asphyxiating point decreased first and then increased with the increase of the concentration of ammonia nitrogen. The bottom of the valley appeared in the 4.90 mg/L experimental group ($P < 0.05$), but there was no significant difference between the 9.80 mg/L experimental group ($P > 0.05$) and the control group ($P > 0.05$). (5) During the experiment, the oxygen nitrogen ratio of tadpoles fluctuated between 18.87—25.34, and the average daily oxygen nitrogen ratio (O:N) increased with the increase of ammonia concentration. The peak NH_3 -N concentration ranges were 4.90—14.70 mg/L and 4.90—9.80 mg/L, respectively. The average oxygen and nitrogen increased first and then decreased in the 7.35 mg/L experimental group ($P < 0.05$).

Key words *Paa spinosa* tadpoles; ammonia; acute toxicity; ammonia excretion rate; oxygen consumption rate; oxygen to nitrogen ratio: (O:N); asphyxiation point