

doi: 10.3969/j.issn.2095-0780.2015.04.012

## 慢性氨氮胁迫对吉富罗非鱼幼鱼生长、免疫及代谢的影响

肖炜, 李大宇, 徐杨, 邹芝英, 祝璟琳, 韩珏, 杨弘

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室, 江苏无锡 214081)

**摘要:** 以吉富罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 幼鱼为对象, 在养殖水体中设置  $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $A_0$ )、 $1.63 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $A_1$ )、 $3.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $A_2$ )、 $6.51 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $A_3$ )、 $13.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $A_4$ ) 共 5 个氨氮质量浓度, 研究氨氮对幼鱼生长特性、免疫功能及营养代谢的影响。研究发现 30 d 氨氮胁迫下, 吉富罗非鱼增重率 (WGR) 和特定生长率 (SGR) 随着氨氮质量浓度上升逐渐下降。免疫功能方面, 随着氨氮质量浓度上升幼鱼白细胞逐渐增多, 血红蛋白质量浓度逐渐下降;  $A_3$  和  $A_4$  组幼鱼血清白蛋白和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性显著低于  $A_0$  组;  $A_4$  组幼鱼血清碱性磷酸酶 (AKP) 活性显著低于  $A_0$ 。营养代谢方面, 氨氮胁迫 30 d 后  $A_3$  和  $A_4$  组幼鱼血清甘油三酯活性显著低于  $A_0$  组;  $A_1 \sim A_4$  组幼鱼血清胆固醇浓度均显著低于  $A_0$  组; 谷丙转氨酶 (ALT) 活性在  $A_3$  和  $A_4$  处理组下显著低于  $A_1$  和  $A_2$  组; 而谷草转氨酶 (AST) 活性在  $A_4$  处理组下显著低于  $A_0$  组。研究结果表明在长期氨氮胁迫下, 吉富罗非鱼幼鱼的生长、非特异性免疫、营养代谢等均受到抑制, 需要在养殖生产中密切关注水体中氨氮质量浓度的变化。

**关键词:** 吉富罗非鱼; 氨氮胁迫; 生长特性; 免疫功能; 营养代谢

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2015)04-0082-07

## Effects of chronic external ammonia stress on growth, immunity and metabolism of juvenile GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*)

XIAO Wei, LI Dayu, XU Yang, ZOU Zhiying, ZHU Jinglin, HAN Jue, YANG Hong

(Key Lab. of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture; Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

**Abstract:** To investigate the effects of chronic external ammonia stress on growth, immunity and metabolism of juvenile GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*), we designed five concentrations of ammonia, including  $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $A_0$ ),  $1.63 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $A_1$ ),  $3.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $A_2$ ),  $6.51 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $A_3$ ) and  $13.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $A_4$ ). The results show that after 30-day feeding, the juveniles' weight gain rate (WGR) and specific growth rate (SGR) decreased significantly with increasing concentration of ammonia. For immunity, the number of white blood cells (WBC) increased but that of hemoglobin (HGB) decreased with increasing concentration of ammonia. Serum albumin (ALB) concentration and superoxide dismutase (SOD) activities of  $A_3$  and  $A_4$  were significantly less than  $A_0$ , while alkaline phosphatase (AKP) concentration of  $A_4$  was significantly less than  $A_0$ . For metabolism, serum triglycerides (TG) concentration of  $A_3$  and  $A_4$  were significantly less than  $A_0$ , while total cholesterol (TC) concentration of  $A_1 \sim A_4$  were significantly less than  $A_0$ . Serum alanine transaminase (ALT) activities of  $A_3$  and  $A_4$  were significantly less than  $A_1$  and  $A_2$ . Meanwhile, only aspartate transaminase (AST) activities of  $A_4$  was less than  $A_0$ . It is revealed that the growth, nonspecific immunity and metabolism of juvenile GIFT tilapia would be inhibited under chronic ammonia stress; change of ammonia concentration in tilapia aquaculture should be paid more attention to.

收稿日期: 2014-10-21; 修回日期: 2014-12-16

资助项目: 现代农业人才支撑计划项目(2130106); 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-49); 中央级公益性科研院所基本科研业务费项目(2013JBFM01); 罗非鱼原良种保种选育

作者简介: 肖炜(1982-), 男, 硕士, 助理研究员, 从事罗非鱼健康养殖研究。E-mail: xiaow@ffrc.cn

通信作者: 杨弘(1966-), 男, 研究员, 从事鱼类遗传育种研究。E-mail: yangh@ffrc.cn

**Key words:** GIFT tilapia; ammonia stress; growth traits; immune function; nutrition and metabolism

吉富罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 是由国际水生生物资源管理中心 (ICLARM) 利用 4 个非洲品系尼罗罗非鱼和 4 个亚洲品系尼罗罗非鱼混合选育获得的品种, 相比其他罗非鱼养殖品种, 吉富罗非鱼具有生长速度快、抢食凶猛、群体产量高等诸多优点<sup>[1]</sup>, 是目前中国罗非鱼养殖的主要品种之一。目前, 吉富罗非鱼的养殖发展由于追求数量、轻管理, 人工集约化养殖密度过大, 残饵、粪便等有机物的快速积累易导致水体中氨氮浓度上升<sup>[2]</sup>, 罗非鱼在氨氮胁迫下生长特性、免疫指标均可能发生变化<sup>[3-4]</sup>, 因而影响罗非鱼的养殖效益; 同时氨氮浓度偏高易造成养殖生态系统失衡, 加剧水体中病原微生物的爆发和蔓延, 易导致罗非鱼病害频发<sup>[5-7]</sup>, 甚至威胁到商品鱼的质量安全。

水体中的氨氮由离子氨 ( $\text{NH}_4^+$ ) 和非离子氨 ( $\text{NH}_3$ ) 组成, 由于  $\text{NH}_3$  不带电荷且具有较强的脂溶性, 容易穿透鱼鳃的脂质生物膜, 对鱼鳃表皮细胞造成损伤, 而  $\text{NH}_4^+$  以一种大的水合离子形式存在, 不能轻易的穿透鱼鳃的脂质生物膜的疏水性微孔进入生物体内<sup>[8]</sup>, 氨氮胁迫影响鱼类正常的生长发育, 严重时甚至导致死亡。作为一个重要的水环境因子, 氨氮对罗非鱼的生理生化指标影响的研究备受重视。陈家长等<sup>[9]</sup>研究了不同作用时间 (0 h、24 h、48 h、96 h 和 120 h) 下不同质量浓度氨氮对吉富罗非鱼血清超氧化物歧化酶 (SOD)、碱性磷酸酶 (AKP)、溶菌酶和补体 C3 活性的影响以及海豚链球菌 (*Streptococcus iniae*) 的易感性变化; 韩春艳等<sup>[10]</sup>将奥尼罗非鱼 (*O. niloticus* × *O. aureus*) 幼鱼暴露于不同质量浓度的氨氮溶液中, 并测定 0 h、12 h、24 h、48 h 和 72 h 肝脏总抗氧化能力 (T-AOC) 及相关抗氧化酶活力、血清溶菌酶等非特异性免疫相关指标。上述研究中氨氮胁迫对罗非鱼的影响研究主要集中在短时间不同氨氮浓度下罗非鱼成活、免疫机制等方面, 长时间低浓度氨氮胁迫对罗非鱼生长及免疫影响的研究尚少见。该研究以吉富罗非鱼幼鱼为对象, 通过不同质量浓度氨氮胁迫处理, 研究 30 d 的氨氮胁迫环境对吉富罗非鱼幼鱼生长及血常规参数、酶活性的影响, 初步揭示氨氮胁迫对幼鱼生长以及反映鱼体免疫力的生理生化机制的影响, 为吉富罗非鱼的科学养殖提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验用鱼及投喂方式

实验用鱼取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心农业部罗非鱼遗传育种中心保种基地, 在循环水养殖系统中养殖约 14 d, 以人工配合颗粒饲料投喂, 日投喂量为鱼体质量的 5% ~ 6%, 每日投喂 2 次 (07:00, 17:00), 每次达到饱食。选择规格、体质量基本一致的健康尼罗罗非鱼 300 尾, 个体初始体质量约为  $(21.3 \pm 0.2)$  g, 随机分为 5 个组, 每组 3 个平行, 每个平行放养实验鱼 20 尾。实验容器为 150 L 圆形塑料桶, 盛放 120 L 养殖水体。

### 1.2 饲养管理

吉富罗非鱼在循环水养殖系统驯化 14 d 后进行氨氮胁迫实验, 通过预实验得知吉富罗非鱼 96 h 半致死质量浓度 (96 h-LC<sub>50</sub>) 为  $130.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 安全质量浓度 (SC) =  $0.1 \times 96 \text{ h-LC}_{50} = 13.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 等比例设计 5 个浓度组: 氨氮质量浓度分别为对照组  $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (A<sub>0</sub>)、 $1.63 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (A<sub>1</sub>)、 $3.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (A<sub>2</sub>)、 $6.51 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (A<sub>3</sub>)、 $13.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (A<sub>4</sub>), 饲养 30 d。实验中每天采用纳氏试剂法<sup>[11]</sup>测定水体中氨氮质量浓度, 然后通过  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{Cl}$  母液进行调节, 实验用水为经充分曝气且除氯的自来水, 实验期间水温为  $(26.0 \pm 1.0)^\circ\text{C}$ , pH 维持在  $7.70 \pm 0.10$ , 溶解氧质量浓度维持在  $5.5 \sim 6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 此时 5 组  $\text{NH}_3$  质量浓度分别为  $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (A<sub>0</sub>)、 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (A<sub>1</sub>)、 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (A<sub>2</sub>)、 $0.19 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (A<sub>3</sub>) 和  $0.38 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (A<sub>4</sub>)。在实验过程中, 每天饱食投喂试验鱼 2 次 (07:00, 17:00), 每次投喂颗粒饲料 30 min 后, 捞取剩余饲料, 每天早晚定时用虹吸管清除粪便, 每晚 (18:00) 定时更换预先配置成相应质量浓度、等温的氯化氨溶液, 用饱和碳酸钠溶液使水的 pH 维持相对稳定。

### 1.3 样品采集和分析

取样前 24 h 停止投喂, 将鱼迅速捞起并立即投入质量浓度为  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 MS-222 中做快速深度麻醉, 首先测量体质量, 然后每个塑料桶取 3 尾鱼, 用一次性医用注射器从尾静脉采血, 所采血样分 2 组, 一组  $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  快速离心 5 min, 取血清, 测量总蛋白 (TP)、白蛋白 (ALB)、球蛋白

(GLO)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、AKP、甘油三脂(TG)、总胆固醇(TC)、葡萄糖(GLU)、皮质醇(COR)、SOD;另一组 EDTA-2K 抗凝,测量白细胞(WBC)、红细胞(RBC)和血红蛋白质量浓度(HGB)、平均血红蛋白质量浓度(MCHC)。所采血清使用 BECKMAN COULTER DXC-800 全自动生化分析仪进行分析测定;所采全血使用 BECKMAN COULTER LH750 全自动血球分析仪测定。按以下公式计算增重率(WGR)和特定生长率(SGR):

$$WGR(\%) = 100 \times (W_t - W_0) / W_0$$

$$SGR(\%) = 100 \times (\ln W_t - \ln W_0) / t$$

式中  $W_0$  为实验开始时鱼体质量(g);  $W_t$  为实验结束时鱼体质量(g);  $t$  为饲养时间(d)。

#### 1.4 数据处理与分析

所有实验数据均用 SPSS 19.0 软件进行单因子

方差分析(One-Way ANOVA),多重比较用 Duncan's 进行差异显著性检验,差异显著临界值均 0.05,结果用“平均值 ± 标准误”( $\bar{X} \pm SE$ )表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 氨氮胁迫对生长指标的影响

实验期间 5 组幼鱼均未出现死亡情况。吉富罗非鱼体质量随着氨氮胁迫时间的延长均有不同程度的增长(表 1)。随着氨氮质量浓度升高,各实验组 WGR 和 SGR 呈清晰下降趋势。结果显示,  $A_2$ 、 $A_3$  和  $A_4$  3 个处理组的幼鱼终末尾均质量、WGR 和 SGR 均显著低于  $A_0$  组( $P < 0.05$ ),  $A_1$  组幼鱼的终末尾均质量、WGR 和 SGR 较  $A_0$  组低,但差异不显著。结果表明水体中氨氮对罗非鱼的生长产生明显的影响,高质量浓度的氨氮明显抑制罗非鱼的正常摄食行为及生长。

表 1 慢性氨氮胁迫对吉富罗非鱼生长性能的影响

Tab. 1 Effect of chronic ammonia stress on growth of GIFT tilapia

组别 group	初始尾均质量/g initial weight	终末尾均质量/g final weight	增重率/% WGR	特定生长率/%·d <sup>-1</sup> SGR
$A_0$ : 0 mg·L <sup>-1</sup>	21.3 ± 0.1	34.6 ± 5.9 <sup>a</sup>	62.4 ± 27.9 <sup>a</sup>	1.57 ± 0.57 <sup>a</sup>
$A_1$ : 1.63 mg·L <sup>-1</sup>	21.3 ± 0.2	32.1 ± 5.5 <sup>ab</sup>	50.5 ± 25.9 <sup>ab</sup>	1.32 ± 0.57 <sup>ab</sup>
$A_2$ : 3.25 mg·L <sup>-1</sup>	21.3 ± 0.1	30.9 ± 4.0 <sup>bc</sup>	45.0 ± 18.6 <sup>bc</sup>	1.21 ± 0.44 <sup>b</sup>
$A_3$ : 6.51 mg·L <sup>-1</sup>	21.3 ± 0.2	29.2 ± 3.4 <sup>cd</sup>	37.1 ± 15.9 <sup>cd</sup>	1.03 ± 0.39 <sup>bc</sup>
$A_4$ : 13.01 mg·L <sup>-1</sup>	21.3 ± 0.2	28.0 ± 3.8 <sup>d</sup>	31.3 ± 17.9 <sup>d</sup>	0.88 ± 0.45 <sup>c</sup>

注:表中同列中字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ );后表同此

Note: Different letters within the same column indicate significant difference ( $P < 0.05$ ); the same case in the following tables.

### 2.2 氨氮胁迫对血液免疫相关指标的影响

氨氮胁迫 30 d 后各实验组中  $A_2$ 、 $A_3$  和  $A_4$  组的幼鱼血液中白细胞数量均显著高于  $A_0$  组( $P < 0.05$ ),白细胞数较  $A_0$  组分别上升了 49.33%、39.91% 和 33.15%,其中  $A_1$  与  $A_0$

组差异不显著;此外,各实验组间血液中红细胞没有显著性差异,但在血红蛋白质量浓度和平均血红蛋白质量浓度方面  $A_1$ 、 $A_2$ 、 $A_3$  和  $A_4$  组均显著低于  $A_0$  组( $P < 0.05$ ),4 个处理组间无显著差异(表 2)。

表 2 慢性氨氮胁迫对吉富罗非鱼血液免疫相关指标的影响

Tab. 2 Effect of chronic ammonia stress on complete blood count of GIFT tilapia

组别 group	$\rho$ (白细胞)/10 <sup>9</sup> ·L <sup>-1</sup> WBC	$\rho$ (红细胞)/10 <sup>12</sup> ·L <sup>-1</sup> RBC	$\rho$ (血红蛋白)/g·L <sup>-1</sup> HGB	平均血红蛋白质量浓度/g·L <sup>-1</sup> MCHC
$A_0$ : 0 mg·L <sup>-1</sup>	215.93 ± 37.84 <sup>a</sup>	2.26 ± 0.25	86.60 ± 5.68 <sup>a</sup>	400.0 ± 40.7 <sup>a</sup>
$A_1$ : 1.63 mg·L <sup>-1</sup>	217.36 ± 43.74 <sup>a</sup>	2.12 ± 0.17	74.14 ± 3.67 <sup>b</sup>	356.3 ± 22.3 <sup>b</sup>
$A_2$ : 3.25 mg·L <sup>-1</sup>	322.44 ± 47.81 <sup>b</sup>	2.28 ± 0.31	78.57 ± 5.00 <sup>b</sup>	353.6 ± 22.1 <sup>b</sup>
$A_3$ : 6.51 mg·L <sup>-1</sup>	302.11 ± 57.21 <sup>b</sup>	2.27 ± 0.20	76.25 ± 7.50 <sup>b</sup>	339.7 ± 19.4 <sup>b</sup>
$A_4$ : 13.01 mg·L <sup>-1</sup>	287.52 ± 39.59 <sup>b</sup>	2.21 ± 0.17	76.14 ± 7.54 <sup>b</sup>	357.6 ± 20.6 <sup>b</sup>

### 2.3 氨氮胁迫对血清生化代谢、免疫相关指标的影响

氨氮胁迫 30 d 后各实验组幼鱼血清中血糖和皮质醇质量浓度均无显著差异; A<sub>3</sub> 和 A<sub>4</sub> 组中甘油三酯质量浓度均显著低于 A<sub>0</sub> 组 ( $P < 0.05$ ), A<sub>1</sub> 和 A<sub>2</sub> 组的甘油三酯质量浓度与 A<sub>0</sub> 组间无显著差异; 在胆固醇质量浓度方面, A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub> 和 A<sub>4</sub> 组均显著低于 A<sub>0</sub> 组 ( $P < 0.05$ ), 4 个处理组间无显著差异; 此外, 随着氨氮质量浓度的升高 ALT 活性出现先上升后下降的趋势, A<sub>3</sub> 和 A<sub>4</sub> 组显著低于 A<sub>1</sub> 和 A<sub>2</sub> 组 ( $P < 0.05$ ), 但与 A<sub>0</sub> 组差异不显著; A<sub>4</sub>

组 AST 活性显著低于 A<sub>0</sub> 组 ( $P < 0.05$ ), A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub> 组的血清 AST 活性与 A<sub>0</sub>、A<sub>4</sub> 组间均无显著差异(表 3)。

氨氮胁迫 30 d 后各实验组幼鱼血清中总蛋白和球蛋白均无显著性差异; A<sub>3</sub> 和 A<sub>4</sub> 组中白蛋白质量浓度均显著低于 A<sub>0</sub> 组 ( $P < 0.05$ ), A<sub>1</sub> 和 A<sub>2</sub> 组的白蛋白质量浓度与 A<sub>0</sub> 组无显著差异; A<sub>4</sub> 组的血清 AKP 活性显著低于 A<sub>0</sub> 组 ( $P < 0.05$ ), 但与 A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub> 组无显著差异; 此外, A<sub>3</sub> 和 A<sub>4</sub> 组中 SOD 活性均显著低于 A<sub>0</sub> 组 ( $P < 0.05$ ), A<sub>1</sub> 和 A<sub>2</sub> 组的 SOD 活性与 A<sub>0</sub> 组差异不显著(表 4)。

表 3 慢性氨氮胁迫对吉富罗非鱼血清生化代谢指标的影响

Tab. 3 Effect of chronic ammonia stress on serum biochemical metabolic indices of GIFT tilapia

组别 group	$\rho$ (血糖)/mmol <sup>-1</sup> glucose	$\rho$ (皮质醇)/ng·L <sup>-1</sup> cortisol	$\rho$ (甘油三酯)/g·L <sup>-1</sup> triglyceride	胆固醇/IU·L <sup>-1</sup> total cholesterol	谷丙转氨酶/IU·L <sup>-1</sup> ALT	谷草转氨酶/IU·L <sup>-1</sup> AST
A <sub>0</sub> : 0 mg·L <sup>-1</sup>	11.4 ± 2.3	251.0 ± 99.2	2.74 ± 1.65 <sup>a</sup>	4.62 ± 1.27 <sup>a</sup>	23.0 ± 5.1 <sup>ab</sup>	158.7 ± 39.0 <sup>a</sup>
A <sub>1</sub> : 1.63 mg·L <sup>-1</sup>	12.4 ± 3.1	240.6 ± 88.7	2.17 ± 0.83 <sup>ab</sup>	3.75 ± 0.62 <sup>b</sup>	25.6 ± 8.1 <sup>a</sup>	137.8 ± 46.8 <sup>ab</sup>
A <sub>2</sub> : 3.25 mg·L <sup>-1</sup>	11.1 ± 2.5	251.6 ± 107.4	2.23 ± 0.78 <sup>a</sup>	3.89 ± 0.80 <sup>b</sup>	25.0 ± 7.9 <sup>a</sup>	148.3 ± 43.1 <sup>ab</sup>
A <sub>3</sub> : 6.51 mg·L <sup>-1</sup>	10.3 ± 1.5	180.3 ± 81.6	1.39 ± 0.32 <sup>b</sup>	3.19 ± 0.34 <sup>b</sup>	16.1 ± 5.6 <sup>b</sup>	115.2 ± 42.4 <sup>ab</sup>
A <sub>4</sub> : 13.01 mg·L <sup>-1</sup>	10.6 ± 3.4	193.3 ± 75.2	1.61 ± 0.43 <sup>b</sup>	3.19 ± 0.42 <sup>b</sup>	16.0 ± 3.8 <sup>b</sup>	97.3 ± 17.6 <sup>b</sup>

表 4 慢性氨氮胁迫对吉富罗非鱼部分血清免疫指标的影响

Tab. 4 Effect of chronic ammonia stress on part serum immunity indices of GIFT tilapia

组别 group	$\rho$ (总蛋白)/g·L <sup>-1</sup> TP	$\rho$ (白蛋白)/g·L <sup>-1</sup> ALB	$\rho$ (球蛋白)/g·L <sup>-1</sup> GLO	碱性磷酸酶/IU·L <sup>-1</sup> AKP	超氧化物歧化酶/IU·mL <sup>-1</sup> SOD
A <sub>0</sub> : 0 mg·L <sup>-1</sup>	34.2 ± 2.3	13.1 ± 1.1 <sup>a</sup>	21.1 ± 1.5	21.3 ± 2.6 <sup>a</sup>	14.1 ± 2.6 <sup>a</sup>
A <sub>1</sub> : 1.63 mg·L <sup>-1</sup>	32.8 ± 2.1	12.3 ± 1.2 <sup>ab</sup>	20.6 ± 1.6	20.7 ± 2.1 <sup>a</sup>	12.1 ± 2.7 <sup>ab</sup>
A <sub>2</sub> : 3.25 mg·L <sup>-1</sup>	34.2 ± 3.3	12.2 ± 0.8 <sup>abc</sup>	21.9 ± 2.6	21.5 ± 2.2 <sup>a</sup>	13.5 ± 1.8 <sup>a</sup>
A <sub>3</sub> : 6.51 mg·L <sup>-1</sup>	33.8 ± 2.4	11.5 ± 0.6 <sup>bc</sup>	22.2 ± 1.9	21.3 ± 2.6 <sup>a</sup>	10.5 ± 2.7 <sup>b</sup>
A <sub>4</sub> : 13.01 mg·L <sup>-1</sup>	33.1 ± 1.6	11.2 ± 1.0 <sup>c</sup>	21.7 ± 1.3	16.6 ± 2.6 <sup>b</sup>	10.9 ± 1.9 <sup>b</sup>

## 3 讨论

### 3.1 慢性氨氮胁迫对吉富罗非鱼幼鱼生长特性的影响

氨氮中 NH<sub>3</sub> 不带电荷且具有较强的脂溶性, 容易穿透脂质生物膜, 因此对水生生物具有毒性, 能降低水生生物的免疫力<sup>[12]</sup>。研究发现高质量浓度氨氮胁迫下 A<sub>3</sub> 和 A<sub>4</sub> 组幼鱼出现胸鳍充血、体表粘液减少、尾鳍腐烂等症状, 充分验证了氨氮的毒性机理。氨氮对水生生物生长具有抑制作用, FOSS 等<sup>[13]</sup> 发现大西洋鳕 (*Gadus morhua*) 幼鱼暴露

于高质量浓度氨氮对其生长产生了显著的抑制作用, 并提出鳕幼鱼养殖下 NH<sub>3</sub> 的 SC 为 0.06 mg·L<sup>-1</sup>; WILSON 等<sup>[14]</sup> 发现塞内加尔鳕 (*Solea senegalensis*) 在 11.6 mg·L<sup>-1</sup> 氨氮质量浓度下养殖 56 d 的生长速率显著低于空白对照, 在 23.2 mg·L<sup>-1</sup> 下基本停止生长; FOSS 等<sup>[15]</sup> 还发现将大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 幼鱼置于 NH<sub>3</sub> 质量浓度为 0.13 mg·L<sup>-1</sup> 和 0.25 mg·L<sup>-1</sup> 的水中养殖 64 d 后平均终体质量显著低于对照组; PAUST 等<sup>[16]</sup> 等设置 0.06 mg·L<sup>-1</sup>、0.12 mg·L<sup>-1</sup> 和 0.17 mg·L<sup>-1</sup> 3 个 NH<sub>3</sub> 环境质量浓度对大西洋比目鱼 (*Hippoglossus hippoglos-*

sus)开展胁迫养殖实验,饲养 62 d 后发现  $0.12 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $0.17 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2 个质量浓度对鱼生长速率有明显抑制作用。实验结果发现氨氮胁迫 30 d 后,  $3.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $6.51 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $13.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组幼鱼终体质量、WGR 和 SGR 均低于空白对照;且随着氨氮质量浓度的增加,对吉富罗非鱼的生长抑制作用明显加强。因此推断吉富罗非鱼幼鱼在慢性氨氮质量浓度下的生长明显受到抑制,且抑制作用与氨氮水平呈正相关。

### 3.2 慢性氨氮胁迫对吉富罗非鱼幼鱼免疫功能的影响

鱼体中的血液作不仅具备运输养分的功能,还在体内防御、免疫、体液调节以及维持内环境相对稳定方面起重要作用<sup>[17]</sup>。血液中白细胞是鱼类主要的免疫细胞,具有吞噬异物产生抗体、抗御病原入侵以及免疫疾病等重要的作用<sup>[18]</sup>。吉富罗非鱼幼鱼氨氮胁迫 30 d 后,  $3.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $6.51 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $13.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  3 个处理组的幼鱼血液中白细胞数量均显著高于空白对照( $P < 0.05$ ),白细胞数较空白对照分别上升了 49.33%、39.91% 和 33.15%,这可能是由于氨氮胁迫引起感染,导致幼鱼体内免疫系统自发调节导致白细胞增多,研究结果与团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)幼鱼<sup>[19]</sup>对氨氮应激后白细胞增多的结果较为相似。血红蛋白是红细胞中运载氧气的功能性蛋白,研究发现  $1.63 \sim 13.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  氨氮胁迫下血红蛋白质量浓度和平均血红蛋白质量浓度均较空白对照显著下降( $P < 0.05$ ),这可能是由于水体中高质量浓度的氨氮会引起水体中亚硝酸盐的升高,通过扩散作用进入红细胞并与血红蛋白发生反应生成高铁血红蛋白和亚硝基血红蛋白<sup>[20]</sup>,此外,长时间氨氮胁迫过程中血红蛋白也会加速分解,导致吉富罗非鱼的功能性血红蛋白质量浓度下降出现“贫血”症状。

鱼类处于生物进化的低级阶段,非特异性免疫系统在鱼体抵抗病原生物入侵时发挥着重要的作用<sup>[9]</sup>。实验发现氨氮胁迫 30 d 后,  $6.51 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $13.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2 个处理组中幼鱼血清白蛋白质量浓度均显著低于空白对照( $P < 0.05$ )。这与南方鲶(*Silurus meridionalis* Chen)幼鱼<sup>[21]</sup>和漠斑牙鲆(*Paralichthys lethostigma*)幼鱼<sup>[22]</sup>受到长期氨氮胁迫的结果相似。白蛋白的下降可能与肝脏受损有关,肝脏是进行蛋白质代谢的主要器官,肝细胞受损可能导致白蛋白等功能蛋白合成下降。

AKP 是一类膜结合糖蛋白,在生物体可直接参与磷酸基团的转移和代谢等生理过程,同时参与调节体内的钙(Ca)、磷(P)代谢<sup>[23]</sup>,其活性变化能够一定程度上指示罗非鱼的免疫状况。实验结果发现  $0 \sim 6.51 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  下罗非鱼血清中的 AKP 活性未有显著差异,而  $13.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的氨氮质量浓度胁迫下吉富罗非鱼幼鱼的 AKP 活性相比空白对照显著降低,说明幼鱼血清的 AKP 活性对水体中氨氮的毒性作用具有一定的自我调节能力,在慢性胁迫 30 d 后  $0 \sim 6.51 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的 AKP 活性均恢复到正常水平。研究结果与黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)幼鱼<sup>[24]</sup>在  $0 \sim 6.72 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  低质量浓度慢性氨氮胁迫下的结果类似,而  $13.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  可能已超过幼鱼的耐受范围,使幼鱼的肝脏等器官受到损伤,干扰了 AKP 的合成功能,因此导致血清中的 AKP 活性显著降低。

SOD 是一种能够催化超氧化物通过歧化反应转化为氧气和过氧化氢的酶,其活性变化可反映机体清除自由基的能力,对于增强吞噬细胞防御能力和整个机体的免疫功能具有重要作用<sup>[25]</sup>,研究发现低质量浓度氨氮胁迫下鱼类的 SOD 活性往往被激活<sup>[26]</sup>。氨氮胁迫 30 d 后,吉富罗非鱼幼鱼血清中 SOD 活性随氨氮质量浓度的提高呈下降趋势,  $6.51 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $13.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2 个处理组的幼鱼血清中 SOD 活性显著低于空白对照。实验中 SOD 作为抗氧化剂的作用随着氨氮质量浓度升高而逐渐减弱,推测可能是因为幼鱼在长时间的氨氮胁迫下细胞内能量不足,使 SOD 合成发生障碍、活性下降,造成过氧化胁迫,从而导致鱼体的免疫能力、抗应激能力和抗病能力的下降。

### 3.3 慢性氨氮胁迫对吉富罗非鱼幼鱼代谢功能的影响

糖类、蛋白质、脂类是生物体内 3 种重要的能源物质。在氨氮胁迫 30 d 后,各试验组幼鱼血清中血糖浓度均无显著差异;  $6.51 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $13.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2 个处理组中甘油三酯质量浓度均显著低于空白对照,  $1.63 \sim 13.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  4 个处理组的胆固醇水平均显著低于空白对照,可以推断幼鱼机体通过加速脂肪分解来满足能量需要。红螯光壳螯虾(*Cherax quadricarinatus*)<sup>[27]</sup>、乌贼(*Sepiella maindroni*)<sup>[28]</sup>等水生动物应对氨氮胁迫时也出现通过提高脂肪的分解来满足机体能量的类似反应。

一般鱼类皮质醇水平随着氨氮质量浓度的升高

而增加。在长时间的氨氮胁迫下,部分血液指标会趋向正常对照生理水平<sup>[29-30]</sup>。此实验发现4个处理组间与空白对照无显著差异,这种规律说明吉富罗非鱼幼鱼具有适应环境胁迫的自动调节能力,可以逐渐适应慢性氨氮胁迫,但是其生长仍然受到一定的影响。ALT和AST是机体中较为典型的2种转氨酶,广泛存在于生物机体内,其作用是催化 $\alpha$ -氨基酸的 $\alpha$ -氨基与 $\alpha$ -酮基互换,是机体内中间代谢的重要反应酶,其活性的高低在一定程度上反映了机体氨基的转移活力<sup>[31]</sup>。实验中随着氨氮质量浓度的升高ALT活性出现先上升后下降的趋势,6.51 mg·L<sup>-1</sup>和13.01 mg·L<sup>-1</sup>处理组显著低于1.63 mg·L<sup>-1</sup>和3.25 mg·L<sup>-1</sup>处理组,但与空白对照差异不显著;13.01 mg·L<sup>-1</sup>组AST活性组显著低于空白对照。结果表明吉富罗非鱼幼鱼在长期氨氮胁迫下,氨基酸代谢可能受到抑制作用,这与部分水生动物短期氨氮胁迫下的ALT、AST活性增强、氨基酸代谢增强的结果正好相反<sup>[22,24,27]</sup>,可能是罗非鱼幼鱼对氨氮浓度更为敏感,实验设置氨氮浓度对幼鱼的代谢系统产生了较大的损伤。

#### 4 结论

慢性氨氮胁迫对吉富罗非鱼幼鱼生长、免疫功能和代谢功能均有显著影响。生长性能方面,吉富罗非鱼幼鱼WGR和SGR随着氨氮水平的上升呈现下降趋势。免疫功能方面,氨氮胁迫30 d后,吉富罗非鱼幼鱼随着氨氮质量浓度的上升血液中白细胞逐渐增多,血红蛋白质量浓度逐渐下降;6.51~13.01 mg·L<sup>-1</sup>氨氮胁迫下幼鱼血清白蛋白和SOD活性显著低于空白对照;13.01 mg·L<sup>-1</sup>氨氮胁迫下幼鱼血清AKP活性显著低于空白对照。营养代谢方面,氨氮胁迫30 d后,6.51~13.01 mg·L<sup>-1</sup>氨氮胁迫下幼鱼血清中甘油三酯质量浓度显著低于空白对照,1.63~13.01 mg·L<sup>-1</sup>氨氮胁迫下幼鱼血清胆固醇水平均显著低于空白对照;ALT活性在6.51~13.01 mg·L<sup>-1</sup>处理组下显著低于1.63~3.25 mg·L<sup>-1</sup>处理组,但与空白对照差异不显著,随水体氨氮质量浓度的升高先上升后下降;而AST活性在13.01 mg·L<sup>-1</sup>处理组下显著低于空白对照。研究结果表明在长期高质量浓度氨氮胁迫下,吉富罗非鱼幼鱼的生长、非特异性免疫、营养代谢等均受到抑制,需要在日常养殖生产中密切关注水体氨氮质量浓度的变化,调控好养殖水质,降低吉富罗

非鱼养殖风险。

#### 参考文献:

- [1] Worldfish Center. GIFT technology manual: an aid to tilapia selective breeding[R]. Penang, Malaysia: Worldfish Center, 2004.
- [2] 刘华丽,曹秀云,宋春雷,等.水产养殖池塘沉积物有机质富集的环境效应与修复策略[J].水生生态学杂志,2011,32(6):130-134.
- [3] RANDALL D J, TSUI T K N. Ammonia toxicity in fish[J]. Mar Poll Bull, 2002, 45(1): 17-23.
- [4] 强俊,徐跑,何杰,等.氨氮与拥挤胁迫对吉富品系尼罗罗非鱼幼鱼生长和肝脏抗氧化指标的联合影响[J].水产学报,2011,35(12):1837-1848.
- [5] SUANYUK N, KONG F, KO D, et al. Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae* in cultured red tilapia *Oreochromis* sp. and Nile tilapia *O. niloticus* in Thailand relationship to human isolates[J]. Aquaculture, 2008, 284(1): 35-40.
- [6] 祝璟琳,杨弘,邹芝英,等.海南养殖罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)致病链球菌的分离、鉴定及其药敏试验[J].海洋与湖沼,2010,41(4):590-596.
- [7] 卢迈新.罗非鱼病害防治和养殖技术进展[J].科学养鱼,2010,251:110-112.
- [8] IP Y K, CHEW S F. Ammonia production, excretion, toxicity, and defense in fish: a review[J]. Front Physiol, 2010, 134(1): 1-20.
- [9] 陈家长,臧学磊,胡庚东,等.氨氮胁迫下罗非鱼(GIFT *Oreochromis niloticus*)机体免疫力的变化及其对海豚链球菌易感性的影响[J].生态环境学报,2011,20(4):629-634.
- [10] 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.
- [11] 中国环境保护局.水和废水监测分析方法[M].北京:中国环境科学出版社,2002:276-281.
- [12] 黄建华,李永,杨其彬,等.斑节对虾家系氨氮耐受性的比较[J].南方水产科学,2012,8(6):37-43.
- [13] FOSS A, SIKAVUOPIO S I, SAETHER B S, et al. Effect of chronic ammonia exposure on growth in juvenile Atlantic cod[J]. Aquaculture, 2004, 237(1): 179-189.
- [14] PINTO W, ARAGAO C, SOARES F, et al. Growth, stress response and free amino acid levels in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) chronically exposed to exogenous ammonia[J]. Aquac Res, 2007, 38(11): 1198-1204.
- [15] FOSS A, IMSLAND A K, ROTH B, et al. Effects of chronic and periodic exposure to ammonia on growth and blood physiology in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Aquaculture, 2009, 296(1): 45-50.
- [16] PAUST L O, FOSS A, IMSLAND A K. Effects of chronic and periodic exposure to ammonia on growth, food conversion efficiency and blood physiology in juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) [J]. Aquaculture, 2011, 315(3): 400-406.

- [17] 赵海鹏. 长吻鮠血液生理、生化指标和血流变特性初步研究[D]. 重庆: 西南师范大学, 2005.
- [18] 陶健芳, 刘来亭, 牛慧军, 等. 白头翁对草鱼免疫功能指标的影响[J]. 饲料研究, 2007(3): 52-54.
- [19] 崔红红, 刘波, 戈贤平, 等. 肌醇对氨氮应激下团头鲂幼鱼免疫的影响[J]. 水产学报, 2014, 38(2): 228-236.
- [20] JENSEN F B. The role of nitrite in nitric oxide homeostasis: a comparative perspective [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009, 1787: 841-848.
- [21] 赵海涛. 氨氮对南方鲈幼鱼血液生理、生化及非特异性免疫指标的影响[D]. 重庆: 西南大学, 2006: 13-16.
- [22] 班同, 尹晶, 吴垠. 氨氮浓度对工厂化养殖漠斑牙鲆血液指标的影响[J]. 河北渔业, 2013(8): 1-5.
- [23] 廖金花, 陈巧, 林丽蓉, 等. 鲍鱼碱性磷酸酶的分离纯化和性质研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2005, 44(2): 272-275.
- [24] 李波. 氨氮和亚硝酸盐对黄颡鱼的毒性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010: 26-28.
- [25] 牟海津, 江晓路, 刘树青, 等. 免疫多糖对栉孔扇贝酸性磷酸酶、碱性磷酸酶和超氧化物歧化酶活性的影响[J]. 青岛海洋大学学报, 1999, 29(3): 463-468.
- [26] SUN H, WANG W, LI J, et al. Growth, oxidative stress responses, and gene transcription of juvenile bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) under chronic-term exposure of ammonia[J]. *Environ Toxicol Chem*, 2014, 33(8): 1726-1731.
- [27] 蒋琦辰, 顾曙余, 张文逸, 等. 氨氮急性胁迫及其毒后恢复对红螯光壳螯虾幼虾相关免疫和代谢指标的影响[J]. 水产学报, 2013, 37(7): 1066-1072.
- [28] 尹飞, 孙鹏, 彭士明, 等. 亚硝态氮和氨态氮急性胁迫下曼氏无针乌贼幼体血液的生化指标[J]. 生态毒理学报, 2011, 6(3): 289-295.
- [29] LEMARIE G, DOSDAT A, COVES D, et al. Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles[J]. *Aquaculture*, 2004, 229(12/3/4): 479-491.
- [30] RUYET J P, LAMES A, ROUX A L, et al. Long-term ammonia exposure of turbot: effects on plasma parameters[J]. *J Fish Biol*, 2003, 62(4): 879-894.
- [31] DEWES L J, SANDRINI J Z, MONSERRAT J M, et al. Biochemical and physiological responses after exposure to microcystins in the crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda Brachyura)[J]. *Ecotox Environ Safe*, 2006, 65(2): 201-208.