

氨氮对中国对虾抗病力的影响*

孙舰军 丁美丽

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 1996年5月24日—6月14日,8月1—19日,分别在青岛的两个养殖场采集海捕产卵后中国对虾亲虾和养殖中国对虾,采用人工添加氨氮并检测对虾与抗菌有关因子的活力的方法,进行氨氮对中国对虾抗病力影响的实验。结果表明,在氨氮浓度较高的实验组,对虾血细胞数目减少,其结构也有变化;酚氧化酶、超氧化物歧化酶和过氧化物酶活力,以及溶菌和抗菌活力都较对照组有明显下降;对病原菌的易感性明显提高。氨氮可降低中国对虾与抗病力有关的酶活力,从而提高中国对虾对病原体的易感性,增加发生疾病的可能性。

关键词 中国对虾 氨氮 抗病力

学科分类号 S945.4

对虾在有机胁迫环境中,虾体内与抗病有关的酶活力明显下降,对病原体的易感性提高(丁美丽等,1997;林林等,1998),经分析,残饵、虾体排泄物等有机物在海水中经微生物分解后可产生大量氨氮、硫化氢、亚硝酸氮等物质,其中氨氮量增加尤为显著,这也与氨是甲壳类蛋白质分解代谢的主要终产物有关。氨氮在高浓度时对虾体有致死作用(Wickens,1976;Chen *et al.*,1990)。近几年的研究表明,即使在低于致死浓度的条件下对对虾生理功能(如氧消耗、氨排泄、ATPase活性及渗透压等)也有显著影响(Chen *et al.*,1992a,b)。目前氨氮已成为中国养虾业中常见的胁迫因子。本文报告氨氮对中国对虾抗病力影响的研究结果,以期为虾病的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验用虾

以中国对虾(*Penaeus chinensis*)(下称对虾)为实验材料。第一批实验于1996年5月24日—6月14日进行,对虾系购于青岛市城阳区上马镇养虾场的产卵后海捕亲虾,平均体长为17cm;第二批实验于1996年8月1—19日进行,对虾系购于即墨市凤城镇北所村养虾场的养殖对虾,平均体长为9.5cm,健康无病。

1.2 实验海水与饵料

取自中国科学院海洋研究所水族楼经沉淀、过滤的海水,海水的各种理化因子见表1。配合饵料由高岛盐场养殖场提供。

1.3 实验方法

* 国家攀登计划B资助项目,PD B-6-7-2号。孙舰军,男,出生于1973年4月,硕士,现在中国科学院南海海洋研究所海洋生物研究室,地址:广州市新港西路164号,邮编:510301,Fax:0086-020-84451672

收稿日期:1997-01-16,收修改稿日期:1998-05-15

表1 实验用海水的化学分析结果(第二批实验)

Tab.1 Results of chemical analysis of saltwater used in test (2nd test)

| 盐度 | pH值 | 温度(°C) | 氨氮(mg/L) | 亚硝酸氮(mg/L) | 溶解氧(mg/L) | 化学需氧量(mg/L) |
|----|------|----------|----------|------------|-----------|-------------|
| 33 | 7.92 | 25.9±0.9 | 0.056 | 0.006 8 | 6.96 | 0.318 |

实验在水体为 0.9m³的水族箱中进行。设置实验池和对照池各一个,每池放养体长为 17cm 的亲虾 12 尾(第一批实验)或体长 9.5cm 左右的养殖对虾 20 尾(第二批实验);两池通气量、温度、投饵量等养殖条件一致。早、晚各投饵一次,每日早晨 8 时将两池水全部更新并吸底。换水后实验池加入 NH₄Cl(第一批实验使氨氮浓度保持在 1.0mg/L 左右,第二批实验使氨氮浓度保持在 2.5mg/L 左右),对照池不加。定期测定水体中氨氮的变化。实验进行到 20d 左右时,取对虾的血或肌肉进行各项测定。

1.4 水质因子的测定

定期从实验池和对照池取水样,测定各项水质因子。氨氮用次溴酸盐氧化法测定;溶解氧(DO)和化学需氧量(COD)分别用碘量法和碱性高锰酸钾法测定;pH 值用自动电位滴定计(ZD-2型,上海第二分析仪器厂)测定;盐度用日本产盐度计(ATAGO SALINITY PERMILL)测定;微生物因子(总异养菌和弧菌的菌量)用三管法检测,其中总异养菌采用海水牛肉膏蛋白胨培养基培养,弧菌采用 TCBS 培养基培养。

1.5 中国对虾与抗病力有关的一些因子的测定

1.5.1 血细胞计数 用注射器从对虾心脏取血,用 10% 福尔马林做固定液(固定液:血 = 1:1),装入 Eppendorf 离心管后混匀,在光镜下观察计数。

1.5.2 与抗病力有关酶活力分析 取 5 尾对虾,用注射器从心脏取血,置于 Eppendorf 管中,在 4°C 静置数小时,取血清进行各项测定。或取肌肉加入 3 倍体积(ml)的磷酸钾盐缓冲液(pH = 6.4, 0.1mol/L),经匀浆器匀浆,然后在 0°C 高速离心(15 000g, 10min),将上清液作为粗酶液进行各项实验。酚氧化酶(PO)活力参照 Ashida(1971)的方法测定;溶菌活力以溶壁微球菌为底物,按 Hultmark 等(1980)的改进方法测定;抗菌活力以大肠杆菌 *E. coli* HB101 为底物,采用 Hultmark 等(1980)的改进方法测定;超氧化物歧化酶(SOD)活力按邓碧玉等(1991)改良的连苯三酚自氧化法测定;过氧化物酶(POD)活力,参照 Srivastava 等(1973)改良的愈创木酚法测定。

1.5.3 对致病菌易感性实验 病原体为副溶血弧菌,浓度调整为 7×10^7 cell/ml 左右,注射量为 0.05ml/ind,注射部位为对虾第 4、5 腹节之间,每组注射 10 尾。

2 结果

第一次实验与第二次实验结果基本一致,以下所列均为第二次实验的结果。

2.1 水质因子的检测结果

2.1.1 氨氮的变化 养虾水体中氨氮昼夜变化见表 2。由表 2 可知,无论是实验组还是

表2 24h内的氨氮变化(mg/L)

Tab.2 Variation of ammonia-N during 24 hours (mg/L)

| 时间 | 10:00 | 15:00 | 20:00 | 8:00 |
|-----|-------|-------|-------|-------|
| 实验组 | 2.448 | 2.548 | 2.555 | 2.593 |
| 对照组 | 0.236 | 0.364 | 0.386 | 0.478 |

对照组,氨氮量在一天之内是持续上升的,这可能与饵料和粪便被微生物分解产氨及对虾本身分泌氨有关。由于实验采用人工定量加入 NH_4Cl ,每天全换水,所以实验池氨氮能保持在 2.5mg/L 左右,而对照池保持在 0.4mg/L 左右,前者高出后者 2mg/L 左右。

2.1.2 其他因子的检测结果 实验过程中盐度保持在 33,其他理化因子的检测结果见表 3。实验中期检测的微生物因子的结果为:本底——异养菌为 9×10^3 ,弧菌为 1.5×10^2 ;对照组——异养菌为 9×10^4 ,弧菌为 5×10^2 ;实验组——异养菌为 1.5×10^5 ,弧菌为 1.8×10^3 (单位均为 cell/ml)。在实验期间,实验池的 COD 略高于对照池,前者 DO 和 pH 值则略低于后者,但二者差异并不显著。

表3 实验过程中COD、DO和pH值的变化

Tab.3 Variation of COD, DO and pH during the experiment

| 日期(年.月.日) | COD(mg/L) | | DO(mg/L) | | pH值 | |
|---------------|-----------|-------|----------|-------|------|------|
| | 对照 | 实验 | 对照 | 实验 | 对照 | 实验 |
| 1996.08.03—04 | 0.556 | 0.615 | 6.660 | 6.630 | | |
| 1996.08.07 | | | | | 7.91 | 7.84 |
| 1996.08.10 | 0.556 | 0.665 | 6.510 | 6.210 | 7.82 | 7.78 |
| 1996.08.15 | 0.777 | 0.854 | 6.650 | 6.860 | 7.96 | 7.93 |

2.2 中国对虾与抗病力有关酶活力的测定结果

实验进行到 20d 左右时,对虾心脏取血或取对虾肌肉匀浆,测定与抗病力有关酶活力,结果见表 4。由表 4 可知,实验组与抗病有关酶活力比对照组有明显的下降。实验组 PO、SOD、POD、溶菌和抗菌等的活力分别比对照组下降了 19.1%、15.1%、21.4%、12.5% 和 36.6%,血细胞数目则下降了 66.4%。

表4 氨氮对中国对虾与抗病有关的酶活力的影响

Tab.4 Effects of ammonia-N on enzyme activities relating to anti-disease ability of *P. chinensis*

| 组别 | PO活力(units) | SOD活力(units) | POD活力 (OD/min) | 溶菌活力 | 抗菌活力 | 血细胞数目 (cell/ml) |
|-----|-------------|--------------|-------------------|-------|-------|--------------------|
| 实验组 | 0.72 | 89.7 | 0.003 3 | 0.147 | 0.296 | 2.40×10^5 |
| 对照组 | 0.89 | 105.6 | 0.004 2 | 0.168 | 0.467 | 7.15×10^5 |

2.3 氨氮对中国对虾的致病菌易感性影响

取实验组、对照组的对中国对虾各 10 尾进行注射弧菌实验,注射后分别培育在养殖环境相同的两个水族箱中,定期观察死亡情况,结果见表 5。实验表明,实验组注射弧菌后死亡率明显高于对照组,这可能与实验组对虾体内免疫及抗病力下降有关。

表5 经注射弧菌后中国对虾的死亡尾数及死亡率

Tab.5 Number and rate of mortality of *P. chinensis* being injected with *Vibrio* sp.

| 组别 | 死亡尾数及死亡率(%) | | |
|-----|-------------|--------|--------|
| | 3h后 | 6h后 | 12h后 |
| 实验组 | 3(30%) | 6(60%) | 8(80%) |
| 对照组 | 2(20%) | 4(40%) | 6(60%) |

3 讨论与结语

3.1 氨氮是水产养殖系统中普遍存在的有毒物质。一些学者根据实验结果认为:任何可测定出的氨氮浓度对鱼类生长都会产生有害影响(Colt *et al.*, 1978)。本实验结果表明:氨氮可降低对虾与抗病力有关的酶活力,如 PO、SOD、POD、溶菌和抗菌等;减少血细胞数量,且对血细胞内部结构也有所影响;因而提高了对致病菌的易感性。这些结果与 Flis (1968)报道的氨氮对鱼类影响——使鱼的腮、肾、肝、脾、甲状腺等组织变化、体内许多酶受到抑制且容易感染疾病等结果基本一致。

3.2 氨氮对虾体抗病力的影响,其原因较为复杂。实验结果显示,氨氮可影响血淋巴中血细胞数量。对虾生活在 2.5mg / L 氨氮水体中经 20d 左右,其血细胞数量显著低于培育在 0.4mg / L 氨氮水体中对虾的血细胞数。这与 Chen 等(1994)用日本对虾实验时获得的“对虾血淋巴中血蓝蛋白浓度随着水体中氨氮浓度提高而降低”的结果相吻合。对虾血细胞在防御中起着重要作用,如透明细胞具有吞噬作用;半颗粒细胞与识别异物能力有关;颗粒细胞内含有大量酚氧化酶原,这种酶原在异物的初始识别中起关键作用(李光友, 1995)。血细胞数量下降势必降低防御能力。在养殖现场对虾血细胞数量显著下降,已成为感染细菌病的标志。同时,随着周围水体中氨氮升高,血淋巴中血蓝蛋白及蛋白质分解增加,游离氨基酸增多(Chen *et al.*, 1994),氨氮浓度上升(Young-Lai *et al.*, 1991),引起血淋巴理化因子变化,也会改变其中与抗病力有关的酶活力。

无脊椎动物的氧耗和氨排泄是反映蛋白质代谢和评价其对各种胁迫因子生理反应的指标。氨氮可增加水养动物对氧的消耗并降低其氨氮排泄。对虾的氧耗在 0.049—9.897mg / L 氨氮范围内是上升的,而氨氮的排泄在 0.965—9.897mg / L 的范围内则是下降的(Chen *et al.*, 1992a)。氧耗增加说明在氨氮胁迫下对能量的需求增加,而氨氮又可促使对虾呼吸色素——血蓝蛋白的分解,降低了其输氧功能(Chen *et al.*, 1994)。氨氮对鱼腮还有损伤(Boyd, 1982; Smart, 1976),导致鱼的呼吸能力减弱。氨氮还会降低对虾的 ATPase 活性(Chen *et al.*, 1992b)。在生物体对氧的需求增加而供氧能力却下降,能量供应又减少的情况下势必导致虾体代谢失调,体质下降,也必然降低其抗病力。

但氨氮对虾体的影响不是恒定的,而是受诸多因子的制约,如水体 pH 值、温度、盐度、溶解氧以及对虾虾体大小及其生理状态。pH 值、温度、盐度主要影响氨氮中非离子氨的比例(Bower, 1978),而非离子氨易于进入虾体产生毒害作用。在前三者中,pH 值对非离子氨的比例影响最大,pH 值的很小变化可引起非离子氨成倍增长。溶解氧对氨氮的毒性影响也较大,低氧可增加氨的毒性(Vermeer, 1987)。另外,对虾对氨氮的耐受力一般随虾体变大而增加,但与对虾所处的生理状态也可能有关。如第一批实验所用的产卵后亲虾体质较弱,在 5.0mg / L 左右的氨氮浓度下 12h 全部死亡,在 1.0mg / L 左右的氨氮浓度下 20d 抗病力明显下降,而第二批实验所用的对虾在 5.0mg / L 浓度下 72h 无一死亡,且在 2.5mg / L 左右 20d 酶活力下降程度与第一批近似。

3.3 养虾池中氨氮浓度随着养殖时间的延续会不断升高,即使在常换水的情况下也是如此。对虾在氨氮不断升高的环境中生活,其抗病力逐渐下降,对病原体易感性提高,疾病也容易发生。因此,控制虾池氨氮浓度是防止疾病发生的关键措施之一。

致谢 本实验所用大肠杆菌(*E. coli* HB101)系山东大学微生物系提供,为抗链霉素菌

种; 弧菌 (*Vibrio* sp. C-25) 由青岛海洋大学海洋生命学院徐怀恕教授提供。在实验中得到朱谨钊老师和宋裕昌老师的热忱帮助和指导, 谨致谢忱。

参 考 文 献

- 丁美丽, 林 林, 李光友等, 1997. 有机污染对中国对虾体内外环境影响的研究. 海洋与湖沼, 28(1): 7—12
- 邓碧玉, 袁勤生, 李文杰, 1991. 改良的连苯三酚自氧化测定超氧化物歧化酶活性的方法. 生物化学与生物物理进展, 18(2): 163
- 李光友, 1995. 中国对虾疾病与免疫机制. 海洋科学, 4: 1—3
- 林 林, 丁美丽, 孙舰军等, 1998. 有机污染提高对虾对病原菌敏感性实验. 海洋学报, 20(1): 90—93
- Ashida M, 1971. Purification and characterization of pro-phenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx morp*. Arch Biochem Biophys, 144: 749—762
- Bower C E, 1978. Ionization of ammonia in seawater: effects of temperature, pH and salinity. J Fish Res Board Can, 25: 1 012—1 015
- Boyd C E, 1982. Water Quality Management for Pond Fish Culture. New York: Science Press, 31
- Chen J C, Ting Y Y, Lin J N *et al*, 1990. Lethal effects of ammonia and nitrite on *Penaeus chinensis* juveniles. Mar Biol, 107: 427—431
- Chen J C, Lin C Y, 1992a. Oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Penaeus chinensis* juveniles exposed to ambient ammonia at different salinity levels. Comp Biochem Physiol, 102C: 287—291
- Chen J C, Nan F H, 1992b. Effect of ambient ammonia on ammonia-N excretion and ATPase activity of *Penaeus chinensis*. Aquat Toxic, 23: 1—10
- Chen J C, Cheng Sha-Yen, Chen Chung-Tin *et al*, 1994. Changes of haemocyanin protein and free amino acid levels in the hemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. Comp Biochem Physiol, 109A: 339—347
- Colt J, Tchobanoglous G, 1978. Chronic exposure of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, to ammonia: effects on growth and survival. Aquaculture, 15: 353—372
- Flis J, 1968. Anatomicohisto-pathological changes induced in carp (*Cyprinus carpio* L.) by ammonia water. Part 2. Effects of subtoxic concentrations. Acta Hydrobiol, 10: 225—238
- Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T *et al*, 1980. Insect immunity: purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. Eur J Biochem, 106: 7—16
- Smart G, 1976. The effect of ammonia exposure on gill structure of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J Fish Biol, 8: 471—475
- Srivastava O P, Van Huystee R B, 1973. Evidence for close association of peroxidase, polyphenoloxidase, and IAA oxidase isozymes of peanut suspension culture medium. Can J Bot, 51: 2 207—2 215
- Vermeer G K, 1987. Effects of air exposure on desiccation rate, hemolymph chemistry and escape behaviour of the spiny lobster, *Panulirus argus*. Fish Bull U S, 85: 45—51
- Wickens J F, 1976. The tolerance of warmwater prawn to recirculated water. Aquaculture, 9(11): 19—37
- Young-Lai W W, Charmantier-oaures M, Charmantier G *et al*, 1991. Effect of ammonia on survival and osmoregulation in different life stages of the lobster *Homarus americanus*. Mar Biol, 110: 293—300

EFFECT OF AMMONIA-N ON ANTI-DISEASE ABILITY OF *PENAEUS CHINENSIS*

SUN Jian-jun, DING Mei-li

(Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract This article is concerned with how ammonia affects anti-disease ability of *Penaeus chinensis* and how it induces shrimp diseases. Tests were carried out in the Cultivation Building of Institute of Oceanology. From May 24 to June 14 and from Aug. 1 to Aug. 19 in 1996; wild parent *P. chinensis* which had hatched (bought from Prawn Farm of Shangma Town, Chengyang District, Qingdao) and cultured *P. chinensis* (bought from Prawn Farm of Beisuo Village, Fengcheng Town, Jimo City) were used as test materials. Two ponds were chosen for testing and control samples, respectively, in each of which the same number of shrimps were reared. Except that fixed ammonium chloride was added into the test pond after renewing saltwater (100%) every day, other culture conditions, such as aeration, temperature and amount of diers, were maintained the same way in the two ponds.

Water was changed at 08:00 am and diets were added twice every day. Physiochemical and microbiological factors, including ammonia-N, dissolved oxygen (DO), chemical oxygen demand (COD), pH, salinity, temperature, total heterotrophic bacteria and *Vibrio* sp., were examined regularly. After about 20 days, the blood of shrimps was taken out or the muscle of shrimps was mixed as materials for each examination; haemocyte number and structure changes of the two group shrimps were compared by hemocytometer and TEM, some enzyme activities relating to antidisease ability were measured by spectrophotometer and susceptibilities to *Vibrio* sp. were tested by injecting shrimps with *Vibrio* sp.

The results show that the haemocyte number of the test shrimps decreased more rapidly than the control and changes in haemocyte structure of the test shrimps occurred; phenoloxidase (PO), superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), bacteriolytic and antibacterial activities of the test sample decreased by 19.1%, 15.1%, 21.4%, 12.5% and 36.6% more than the control one, respectively. In addition, the test group had higher susceptibilities to pathogenic bacteria *Vibrio* sp. than the control one.

In conclusion ammonia-N can reduce enzyme activities of *P. chinensis* relating to anti-disease ability, increase its susceptibility to pathogen, and make it easy for diseases to occur.

Key words *Penaeus chinensis* Ammonia-N Anti-disease ability

Subject classification number S945.4