

分子氨和亚硝酸盐对鱼类的危害及其对策*

余瑞兰 聂湘平 魏泰莉 郭叶华 赖子尼

(农业部热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室, 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广州 510380)

冯志荣

(广东省南海市西樵山旅游度假区农办, 南海 528210)

摘 要 鱼类养殖池塘主要生态因子调查结果显示, 多病池水含总氨氮、分子氨、亚硝酸盐均比少发病池高, 而溶解氧较低; 分子氨和亚硝酸盐对鲫和鳊毒性影响试验结果, 分子氨的毒性使鲫和鳊血清碱性磷酸酶(AKP)、溶菌酶(LSZ)的活力发生变化, 经120 h作用, 鲫 AKP 由上升转为下降, 鳊经96 h作用而逐渐下降; 亚硝酸盐的毒性使鲫的高铁血红蛋白(MHb)呈指数递增。这说明养殖水体溶氧低、分子氨和亚硝酸盐浓度高, 三者协同作用, 使鱼类代谢功能失调, 免疫力下降, 是诱发鱼类发病的主要环境因素。

关键词 池塘, 分子氨, 亚硝酸盐, 鱼病, 致病因子

精养池塘由于残饵和鱼类排泄物沉积于池底而产生大量的氨和亚硝酸盐。据报道, 池水积累一定量的分子氨对鱼鳃表皮细胞会造成损伤而使鱼的免疫力降低^[1]; 亚硝酸盐达到一定浓度易引起鱼类中毒而使血液里高铁血红蛋白的含量升高, 载氧能力下降, 造成组织缺氧, 神经麻痹, 甚至窒息死亡^[2]。有研究发现, 发病池塘的分子氨和亚硝酸盐浓度均高于未发病池塘, 且认为分子氨和亚硝酸盐是诱发鱼病的环境因子^[3,4]。

有关分子氨和亚硝酸盐与鱼病发生相关性的报道较多, 而有关其诱发鱼病发生的临界值的研究至今未见报道。

为深入了解分子氨和亚硝酸盐与鱼类病害的相关性, 作者于1996~1998年7月调查了60多口鱼类养殖池塘水体主要生态因子, 并以名优鱼类为对象进行分子氨和亚硝酸盐的毒性影响及其调控试验, 为深入研究诱发鱼病生态因子及其调控措施提供依据。

收稿日期: 1998-11-05

* 农业部“九五”重点科研项目(渔95-B-96-06-04)

1) 胡益民, 等. 鲫、鳊、鳙等养殖鱼类暴发性疾病与水质环境关系调查初报. 鱼类病害研究, 1991, 13(3): 41~44

1 材料和方法

1.1 调查内容

调查包括多病与少病(或不发病)两类池塘水体8项主要生态因子及其差异。

1.2 材料

1.2.1 试验鱼 加州鲈(*Micropterus salmoides*)体长3.6~4.2 cm, 体重0.56~0.70 g; 鳊(*Hypophthalmichthys molitrix*)体长4.9~5.8 cm, 体重0.94~1.32 g; 彭泽鲫(*Carassius auratus var pengze*)体重200~300 g; 鳙(*Siniperca kneri*)体重100~200 g。均取自本所养殖场, 试验前室内暂养1周。

1.2.2 试验菌种 溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikicus*), 中国科学院微生物所提供。

1.2.3 试验药物 NH_4Cl , NaNO_2 均为分析纯化学试剂。

1.2.4 试验容器 180 L 玻璃水族箱, 12 L 圆柱型玻璃缸。

1.2.5 试验用水 自然曝气24 h 自来水。主要水质参数, 水温22~23.5℃; pH 7.20~7.35; 溶氧7.2~8.4 mg/L; 氯化物30~32 mg/L; 以 CaCO_3 计的总硬度和总碱度分别为82.0~91.2 mg/L 和56.1~58.0

mg/L; 氨氮和亚硝酸盐都是痕量。

1.3 试验方法

1.3.1 毒性试验 用单因子静态试验法, 试验期间间隔 24 h 全换试液, 求 96 h LC_{50} 值再乘以安全系数 0.1, 求出安全值。

1.3.2 高铁血红蛋白(MHb)测定 参照《临床生化检验》^[5], 于鱼的大动脉取血(每一浓度组试验鱼 4 尾, 试验结果取平均值), 肝素抗凝, 光电比色测定。

1.3.3 血清碱性磷酸酶活力(AKP)测定 β -甘油磷酸法^[5]。

1.3.4 血清溶菌酶活力(LSZ)测定 琼脂平板法和比浊法^[6]。血清由腹大动脉采血(每一浓度组试验鱼 4 尾, 试验结果取平均值)沉降红血球分离而得。

2 结果

2.1 调查结果(表 1)

表 1 8 项生态因子测定结果

Table 1 The observed results of main ecological factors in water

生态因子 ecological factor	鱼塘 pond					
	多病 frequently diseased			少病或无病 seldom diseased		
	测定值 measured data	超标率/% superstandar rate	均值 average	测定值 measured data	超标率/% superstandar rate	均值 average
水温/ $^{\circ}\text{C}$ water temperature	29~31	—	30.2	26~31	—	—
透明度/cm * transparency	12~16	100	13.2	15~26	61.9	18.2
pH	6.70~8.00	0	7.23	6.74~8.65	4.8	7.58
溶氧/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) DO	3.32~6.12	64.5	4.24	3.61~7.21	32.5	5.09
COD_{Mn} /($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	12.10~16.34	100	13.20	7.60~12.72	83.8	11.42
总氨氮/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) ammonia - N	0.480~6.730	96.5	2.710	0.076~2.620	45.2	0.950
$\text{NH}_3 - \text{N}$ /($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.011~0.926	64.5	0.153	0.001~0.048	24.2	0.027
$\text{NO}_2 - \text{N}$ /($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.084~1.594	85.5	0.840	0.002~0.394	29.0	0.176

* 据调查, 鱼塘较好的水质其透明度为 20~25 cm, 因此以 20~25 cm 为参考标准。It is reported that, for a fish pond, the better water quality should be characterized by its transparency from 20cm to 25cm which is used as a referent standard.

2.2 试验结果

2.2.2 分子氨对鳊和鲫的毒性影响

2.2.1 分子氨和亚硝酸盐对加州鲈、鲢的急性毒性(表 2)

(1) 鲫 AKP 的变化, 见表 3。鲫在不同浓度的试

表 2 分子氨、亚硝酸盐对加州鲈、鲢的 LC_{50} 和安全浓度

Table 2 LC_{50} and safe concentration of $\text{NH}_3 - \text{N}$, $\text{NO}_2 - \text{N}$ to *M. salmoides* and *H. molitrix*

$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

试验鱼 sample	致毒时间/h poisoned time	$\text{NH}_3 - \text{N}$			$\text{NO}_2 - \text{N}$		
		LC_{50}	95% 可信限 95% confidence	安全浓度 safe concentration	LC_{50}	95% 可信限 95% confidence	安全浓度 safe concentration
加州鲈鱼 <i>M. salmoides</i>	24	0.99			134.5		
	48	0.96			116.6		
	96	0.86	0.77~1.03	0.086	112.2	98.6~130.1	11.22
鲢 <i>H. molitrix</i>	24	2.47			78.1		
	48	1.95			63.2		
	96	1.56	1.34~1.83	0.156	43.2	32.2~57.8	4.32

液里经过 72 h 的试验, 开始出现不同程度的中毒症状, 尤其是高浓度组, 体色加深, 游动缓慢, 呼吸急速。96 h 后高浓度组出现死鱼现象, 死鱼鱼鳃苍白, 有少量鳃丝糜烂。

由表 3 看出, 鲫在不同浓度的试液里, 经过不同

时间的暴露后, AKP 发生了变化; 将 AKP 与 $\text{NH}_3 - \text{N}$ 浓度进行回归分析, 结果, 随 $\text{NH}_3 - \text{N}$ 浓度的升高, 48 h 后 AKP 呈对数曲线增长, 方程为:

$$Y = 7.582 + 5.691 \lg X (\text{不含 } X_0, R^2 = 0.9812);$$

72 h 后 AKP 呈抛物线变化, 方程为:

$$Y = 1.608 + 7.103X - 5.099X^2 (R^2 = 0.9907);$$

96 h 后 AKP 出现微量的递增, 直线方程为:

$$Y = 1.671 + 0.392X (R^2 = 0.9822);$$

120 h 后 AKP 呈现直线衰减, 其方程为:

$$Y = 1.703 - 0.219X (R^2 = 0.9762)。$$

以上试验结果表明, 鲫在 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度 0.18~1.00 mg/L 中暴露 72 h 后, AKP 由递增向递减变化, $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度 0.70 mg/L 为 AKP 递减的临界值。

(2) 鳊 AKP 的变化, 见图 1。鳊暴露于 0.05~0.325 mg/L($\text{NH}_3\text{-N}$) 的试液里, 经 96 h 后, AKP 与 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度呈抛物线变化, 方程为:

$$Y = 6.2656 + 11.908X - 79.49X^2 (R^2 = 0.9852)。$$

经计算, 96 h $\text{NH}_3\text{-N}$ 0.143 mg/L 为 AKP 递减的临界值。

表 3 鲫 AKP 测定结果

Table 3 The results of *C. auratus* AKP

鲍氏单位/100 ml Bodansky

时间/h exposure time	$\text{NH}_3\text{-N}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$				
	0	0.18	0.32	0.56	1.00
48	1.665±0.04	3.447±0.297	4.519±0.263	6.243±0.430	7.603±0.686
72	1.710±0.09	2.868±0.231	3.289±0.189	4.136±0.247	3.675±0.193
96	—	1.708±0.042	1.807±0.051	1.902±0.112	2.060±0.121
120	—	1.669±0.061	1.653±0.102	1.573±0.031	1.481±0.027

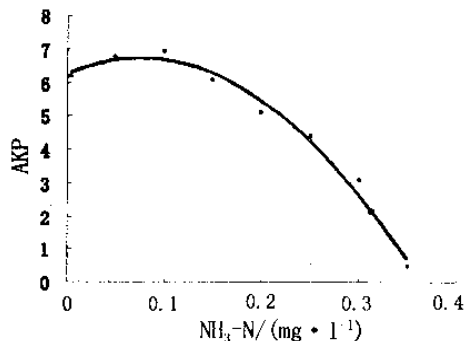


图 1 不同 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度鳊 96 h AKP 的变化

Fig. 1 Stepwise regression curve of *S. kneri* AKP in 96 h

(3) 鲫 LSZ 的变化, 见表 4。鲫在不同浓度的试液里, 经过不同时间的暴露后, 血清溶菌酶对微球菌溶解度随浓度的升高和暴露时间的延长而下降, 经方差分析, 试验组与对照组比较, 48 h 各浓度组与对照组差异不显著, 96 h $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度 0.56 和 1.00 mg/L 两组有显著差异 ($P < 0.05$), 120 h 后各浓度组均有极显著的差异 ($P < 0.01$)。96 h $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度 0.56 mg/L 是鲫 LSZ 下降的临界值。

2.2.3 亚硝酸盐对鲫血红蛋白的毒性影响 在不同浓度的试液中, 鲫经 48 h 的试验后, 体色加深, 呼吸急

表 4 鲫的 LSZ 测定结果

Table 4 Results of *C. auratus* LSZ

$\mu\text{g}/\text{ml}$ (血清, sterum)

时间/h exposure time	$\text{NH}_3\text{-N}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$				
	0	0.18	0.32	0.56	1.00
48	5.87±0.31	5.52±0.29	5.56±0.37	5.46±0.41	5.41±0.41
96	—	5.29±0.36	5.14±0.36	4.75±0.61	4.21±0.41
120	—	3.92±0.31	3.90±0.42	3.46±0.40	3.40±0.28

速, 浮上水面; 144 h 后高浓度组出现死亡现象, 死鱼鳃呈暗红色。

鲫经过不同时间的毒性影响, 其血红蛋白(Hb)、MHb 浓度发生变化(表 5), 随着 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度增加, 血液中 MHb/Hb 也增加, 低浓度组(1.0、2.0 mg/L)增加缓慢, 高浓度组增加较快; 48 h 后 4.0 mg/L 浓度组的 MHb/Hb 由 3.2% 增至 31.4%, 为对照组的 15 倍;

对 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度和 MHb/Hb 的回归分析表明, 它们之间存在着指数增长关系; 96 h 后 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度与 MHb/Hb 同样是指数增长关系(图 2)。

由表 5 看出, 鲫在 144 h 后, 各浓度组的 MHb/Hb 与 96 h 无显著差异。

经 $\text{NO}_2\text{-N}$ 48 h 对鲫的毒性影响后, MHb/Hb 由低向高递增, 1.0 与 2.0 mg/L 浓度组出现显著差异, 根据曲线方程推算, $\text{NO}_2\text{-N}$ 1.82 mg/L 是 MHb/Hb 递增由慢向快的转折点即临界值; 同样, 96 h 的毒性

* 临界值由实测值经方差分析而算出

影响中 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 浓度的临界值为 0.80 mg/L 。

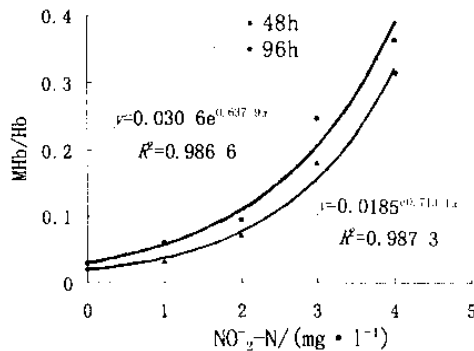


图 2 48、96 h 不同 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 浓度鲫 MHB/Hb 的变化

Fig. 2 Regression curve of $\text{NO}_2^- - \text{N}$ and MHB/Hb of *C. auratus* in 48h, 96 h

3 讨论

(1)碱性磷酸酶遍布于动物体各组织,其中以骨、肝脏、胆囊、肠粘膜等含量丰富,其活力的异常变化反映了机体代谢功能失常或组织受损伤以致免疫力下降^[5]。溶菌酶广泛存在于动物体组织和体液中,是构成机体非特异性免疫功能的因素之一;体液中的溶菌酶含量会因动物体发生炎症、感染、组织损伤而改变^[6],它在一定程度上能反映机体的免疫力。

试验证明,一定浓度的分子氨对鲫和鳊致毒后,其 AKP 和 LSZ 均发生变化;鲫的酶活力变化过程中,72 h $\text{NH}_3 - \text{N}$ 浓度 0.70 mg/L 和 96 h 浓度 0.56 mg/L 分别是鲫 AKP 和 LSZ 衰减的临界值;96 h 浓度 0.143 mg/L 是鳊 AKP 衰减的临界值。

表 5 鲫的 Hb 和 MHB 测定结果

Table 5 The results of Hb and MHB of *C. auratus*

处理时间/h exposure time	测定内容 item	$\text{NO}_2^- - \text{N}/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$				
		0	1.0	2.0	3.0	4.0
48	Hb	13.71 ± 0.83	14.01 ± 1.01	16.25 ± 0.73	13.18 ± 0.91	12.30 ± 0.80
	MHB	0.29 ± 0.06	0.45 ± 0.45	1.17 ± 0.20	2.36 ± 0.0	3.96 ± 0.61
	MHB/全 Hb	2.1%	3.2%	7.2%	17.9%	31.4%
96	Hb	12.81 ± 0.59	13.02 ± 0.68	12.84 ± 0.53	11.19 ± 0.87	12.02 ± 0.79
	MHB	0.39 ± 0.05	0.79 ± 0.20	1.24 ± 0.49	2.76 ± 0.47	3.99 ± 0.37
	MHB/全 Hb	3.0%	6.1%	9.6%	24.7%	36.2%
144	Hb	—	13.43 ± 0.92	13.00 ± 1.05	11.07 ± 0.81	10.12 ± 0.63
	MHB	—	0.97 ± 0.22	2.01 ± 0.37	2.18 ± 0.22	3.51 ± 0.29
	MHB/全 Hb	—	7.2%	15.5%	19.7%	34.6%

(2)试验证明,鲫受一定浓度亚硝酸盐毒性影响后其血液中的 MHB 含量随 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 浓度的升高呈指数增长,48 h $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 浓度 1.82 mg/L 和 96 h 浓度 0.80 mg/L 是毒性影响的临界值。

(3)60 多口鱼塘水体 8 项主要生态因子的调查分析结果,多发病池水含总氮、分子氨、亚硝酸盐明显高于少发病或未发病的池水,而溶氧低于少发病的池水,高温季节中这种差异更为显著。

(4)养殖池塘的调查结果及分子氨和亚硝酸盐测试结果说明,池水溶氧不足,分子氨、亚硝酸盐含量高,三者之间存在协同作用,鱼类生活在这种恶劣环境中,其机体代谢功能失调,免疫力下降,病害必然会发生。因此,养殖水体中三者之间的协同作用是诱发鱼病发生的主要环境因素。

(5)控制养殖水体分子氨和亚硝酸盐浓度低于其产生毒性影响的临界值,具体对策主要有:①增氧,科

学使用增氧机,保持池水一定数量浮游藻类,定期注入新水,使用适量的增氧剂,如过氧化氢、过氧化钙等。②施用氧化剂,池水定期泼洒 $0.3 \sim 0.5 \text{ mg/L}$ NaClO , $5 \sim 10 \text{ mg/L}$ ClO_2 (含 ClO_2 5%),促使 $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ 。③投入适量氯离子, Cl^- 对 NO_2^- 的毒性有拮抗作用, 20 mg/L 的 Cl^- 可消除 25%~30% 的 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 。④斜发沸石,对 NH_4^+ 有选择性吸附,池水投入 $30 \sim 50 \text{ mg/L}$ 可除去约 30% 的 NH_4^+ 。⑤使用微生物制剂,池塘由于施用杀虫灭菌剂,有益微生物较少,投入纯培养光合细菌,硝化细菌等微生物制剂可净化池水。

参 考 文 献

- Colt J E, D A Armstrong. Nitrogen toxicity to crustaceans, fish and mollusks. In: L J Allen, E C Kinney (eds). Proceedings of the Bio-Engineering symposium for Fish Culture. American Fisheries Society and northeast society of conservation engineers. Bethesda, MD, 1981. 34~47

- 2 Steven R Krous, et al. Effect of acclimation time on nitrite movement across the gill epithelia of rainbow trout, the role of "chloride cell" pro. Fish - Cult, 1982, 44(2):126~130
- 3 王鸿泰, 等. 池塘中亚硝酸盐对草鱼种的毒害及防治. 水产学报, 1989, 13(3):207~213
- 4 赵玉宝, 等. 生态管理与暴发性鱼病. 淡水渔业, 1994, 24(1):23~25
- 5 上海市医学化验所主编. 临床生化检验. 上海:上海科学技术出版社, 1982. 350~354
- 6 上海第一医学院主编. 环境卫生学. 北京:人民卫生出版社, 1981, 555~557

Toxicity of molecular ammonia & nitrite to fishes and the control measures

Yu Ruilan Nie Xiangping Wei Taili Guo Yehua Lai Zini

(Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fish Breeding & Cultivation,

Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380)

Feng Zhirong

(Agricultural Office of Xiqiao Town Nanhai City Guangdong Province, Nanhai 528210)

Abstract The investigation on the key ecological factors in the ponds for culturing qualified rare fishes shows that the frequently disease - caught ponds have higher total ammonia, molecular ammonia and nitrite than the unfrequently disease - caught ponds, but have lower dissolved oxygen. We have also tested the impact on fishes. The toxicity of molecular ammonia makes the vigor of blood serum alkaline phosphates and lysozyme in goldfish and bigeye mandarin fish change, and the AKP in goldfish begins to decrease after 120 h's testing while the AKP in bigeye mandarin fish is the same after 96 h's testing. The toxicity of nitrite makes the index of MHB in goldfish increase. Based on the above results, it can be concluded that lower dissolved oxygen, together with higher molecular ammonia and nitrite will lead to off balance of metabolic function in fishes and decrease in immunological competence. All those results in highly frequent disease caught by the qualified rare cultured fishes.

Key words pond, $\text{NH}_3 - \text{N}$, $\text{NO}_2^- - \text{N}$, fish diseases, pathogenic factor