

氨氮对凡纳对虾免疫指标的影响

姜令绪, 潘鲁青, 肖国强

(中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛, 266003)

摘要:以凡纳对虾(*Litopenaeus vannamei*)为研究对象,研究氨氮对其免疫指标的影响。实验氨氮质量浓度梯度设置为0.05(对照)、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/L,各氨氮梯度用4 g/L的氯化铵溶液来调节。将暂养在自然海水(对照)中的凡纳对虾分别放入各实验梯度中,对虾体长为(8.5±0.5) cm。结果表明,氨氮对凡纳对虾血细胞数量、血清中的酚氧化酶活力、溶菌和抗菌活力的影响显著($F > F_{0.05}$),且随着氨氮质量浓度的升高,血细胞数量和溶菌、抗菌活力降低,酚氧化酶活力升高;在0~24 h实验时间内,各处理组(对照组除外)对虾血细胞数量和溶菌、抗菌活力呈下降趋势,酚氧化酶活力呈上升趋势,24 h后稳定在较低水平上。实验说明,随着氨氮水平升高,凡纳对虾免疫力明显下降,对病原菌的易感性提高,因此在养殖过程中,环境氨氮变化幅度不应超过0.5 mg/L,或长时间维持在较高氨氮水平(>0.5 mg/L)。

关键词:氨氮;凡纳对虾;血细胞数量;酚氧化酶活力;溶菌活力;抗菌活力

中图分类号:Q959.223.63 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2004)06-0537-05

氨氮是对虾养殖环境中重要的污染胁迫因子,主要由对虾残饵、排泄物等有机物分解产生。许多学者研究认为在低于致死浓度的条件下,氨氮对对虾鳃组织和生理功能(如氧消耗、氨排泄、渗透调节等)具有显著影响^[1-3]。在对虾养殖过程中,经常因水环境变化如浮游植物优势种群的突然死亡和过量投饵等原因,导致水环境中氨氮浓度突然升高,促使虾病暴发的现象。已有研究表明在高浓度氨氮长时间作用下,对虾血细胞数量及其吞噬活性减少,抗病力明显下降,对病原菌的易感性提高^[4-6]。本实验研究了在亚致死浓度下氨氮突变对凡纳对虾(*Litopenaeus vannamei*)免疫力的影响,探讨了对虾免疫调控的环境生理学机制,旨在对虾养殖水环境调控和病害防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用凡纳对虾于2002年12月购自青岛市营海对虾养殖场,体色正常,健康活泼,生物体长为(8.5±0.5) cm。暂养8~10 d,海水盐度为30, pH为8.5,温度为(23±0.5)℃,连续充气,日换水2次,换水量为1/3~1/2,并投喂对虾配合饲料。

1.2 实验方法

1.2.1 氨氮梯度的设置 实验设置6个梯度,氨氮质量浓度分别为0.05(对照)、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/L,各梯度用4 g/L的氯化铵溶液来调节。实验前将对虾先饥饿48 h。实验在50 cm×40 cm×30 cm的塑料水槽内进行,将暂养在自然海水(对照)中的凡纳对虾分别放入各实验梯度中,每个水槽分别放健康的凡纳对虾20尾,每个梯度均设3个平行组,实验期间不投喂饵料,养殖管理过程与暂养期间的养殖条件完全相同,换水时分别加入相对应氨氮质量浓度的养殖用水。在实验过程中,每隔4 h用次溴酸盐法测定一次氨氮浓度,实测值分别为(0.12±0.05)、(0.53±0.02)、(1.08±0.10)、(1.48±0.05)、(2.06±0.07)、(2.58±0.04) mg/L,实验期间对虾无死亡现象,取样时间为第0、4、8、12、24、48小时,各实验梯度每个水槽随机取虾3尾。

1.2.2 样品制备 用消毒的5号针头和1 mL注射器从凡纳对虾头胸甲后插入心脏中取血,注射器中预先加入已消毒的预冷抗凝剂,使血液与抗凝剂最终体积比为1:1,血液置于冰箱(4℃)中保存,用于血细胞计数的样品,在离心管中混匀后,观察计数;其他血液样品则经低速离心(3 000 r/min, 4℃)

收稿日期:2004-04-29; 修订日期:2004-06-04。

基金项目:山东省科技兴海项目资助(2001-3-6)。

作者简介:姜令绪(1978-),男,硕士,从事甲壳动物生理学研究。

通讯作者:潘鲁青, E-mail: panlq@ouc.edu.cn

15 min 后,将析出的蓝色血清倾出,进行各项免疫指标的测定。

1.2.3 测定方法 血细胞数量测定采用血球计数板在 Olympus 光学显微镜下直接计数的方法;酚氧化酶活力的测定以 L-DOPA 为底物,按 Ashida^[7] 的方法进行;溶菌活力和抗菌活力(A,B)测定分别以溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*) 冻干粉和副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 菌悬液为底物,参照 Hultmark^[8] 等改进的方法。

1.2.4 数据处理与分析 所有实验数据均以3个平行组数据的平均值表示;实验数据分析采用单因素方差分析(ANOVA)。

2 结果与分析

2.1 氨氮对凡纳对虾血细胞数量的影响

由图1可见,经单因素方差分析(ANOVA),氨氮对凡纳对虾血细胞数量的影响显著 ($F > F_{0.05}$),且随着氨氮浓度的升高而降低;在 0~24 h 实验时间内,各处理组(对照组除外)对虾血细胞数量呈下降趋势,24 h 后趋于稳定。

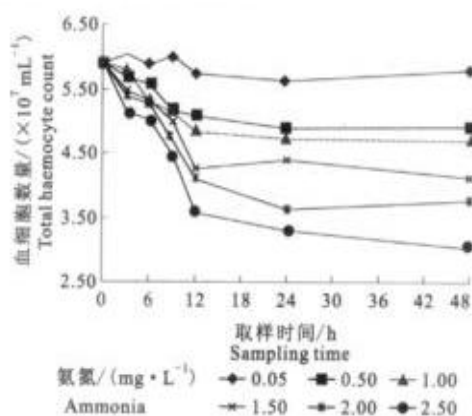


图1 氨氮对凡纳对虾血细胞数量的影响

Fig.1 Effect of ammonia-N on haemocyte count of *L. vannamei*

2.2 氨氮对凡纳对虾血淋巴中免疫指标的影响

图2表明,经单因素方差分析(ANOVA),氨氮对凡纳对虾血清中酚氧化酶活力、溶菌和抗菌活力的影响显著 ($F > F_{0.05}$),且随着氨氮浓度的升高,酚氧化酶活力逐渐增大,溶菌和抗菌活力逐渐减少。在实验时间内,对照组各免疫指标变化不明显,而其他各处理组酚氧化酶活力呈上升趋势,溶菌和抗菌活力呈下降趋势,24 h 后基本趋于稳定。

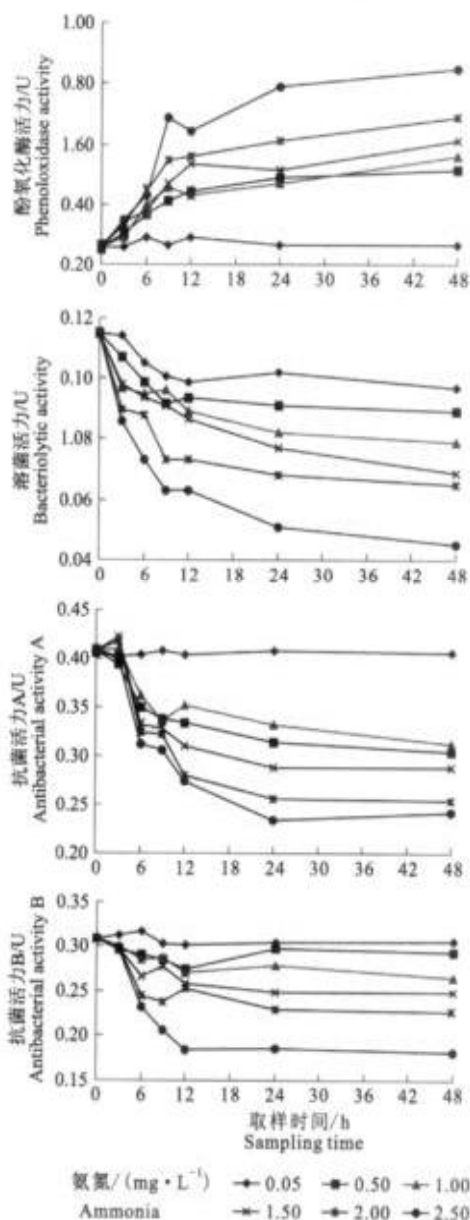


图2 氨氮对凡纳对虾血淋巴中各免疫指标的影响

Fig.2 Effects of ammonia-N on immune parameters in haemolymph of *L. vannamei*

3 讨论

3.1 氨氮对凡纳对虾免疫力的影响

氨氮是对虾养殖环境中存在的一种有害物质,在水体中以离子氨 (NH_4^+) 和非离子氨 (NH_3) 2 种形态存在,它们之间可以相互转换,其中非离子氨因为不带电荷,具有较强的脂溶性,能够穿透细胞膜,表现出毒性效应。已有研究表明,随着氨氮浓度升

高,对虾耗氧量增加,血淋巴蛋白、血蓝蛋白或氧合血蓝蛋白浓度降低^[9-11]。许多研究表明,随着水环境中氨氮浓度的升高,甲壳动物血淋巴及组织中的氨氮浓度增加,氨氮的排泄减少,从而导致血淋巴pH升高^[10,12-13]。由此说明随着氨氮浓度的升高,对虾的耗氧量升高,能量需求增加,同时因为血淋巴中氧合血蓝蛋白浓度降低和pH升高,降低了血液的输氧能力,导致能量供给减少和氮代谢失调。

据孙舰军等^[4]报道,处于高氨氮水平(2.5 mg/L)下20 d时中国对虾(*Penaeus chinensis*)血细胞数量减少,溶菌、抗菌活力及超氧化物歧化酶活力明显下降,对病原菌的易感性提高;Le Moullac等^[14]研究发现,随着氨氮水平升高(0→3.0 mg/L),细角滨对虾(*Litopenaeus stylirostris*)血细胞数量降低约50%,血淋巴酚氧化酶活力明显升高;Cheng^[5,15]研究指出,随着氨氮水平(0.02~3.07 mg/L)的升高,7 d后罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)血细胞酚氧化酶活力、吞噬活性和对细菌的清除率明显降低,对病原菌(*Lactococcus garvieae*)的易感性提高;Liu等^[6]研究发现,随着氨氮水平升高(0.01→21.60 mg/L),168 h后凡纳对虾血细胞酚氧化酶活力、吞噬活性和清除率降低,抗病力下降。由此表明,长时间处于高氨氮浓度下,对虾血细胞数量及其吞噬活性减少,抗病力明显下降,对病原菌的易感性提高。本实验表明,各处理组在氨氮突变6 h时免疫力指标明显下降,随着实验时间的增加,凡纳对虾血细胞数量逐渐减少,溶菌和抗菌活力逐渐下降,24 h后稳定在较低水平上。作者认为,在氨氮浓度突变后,对虾在短时间内因应激反应导致机体能量需求增加,而能量供给减少和体内氮累积增加所产生的毒性效应,会引起机体生理代谢失调,免疫力明显下降,对病原的易感性提高,从而容易暴发疾病。因此,在凡纳对虾的养殖过程中,若水环境中的氨氮浓度突变超过0.5 mg/L或长时间维持在较高的氨氮水平(>0.5 mg/L)上时,要及时采取措施降低氨氮浓度。

3.2 对虾免疫调控的环境生理学机制

对虾的免疫调节机制属于非特异性免疫,主要由血细胞以及血淋巴中的活性因子来完成。其中酚氧化酶原激活系统在对虾免疫识别和防御中起着关键作用,通过细胞间的信息传递,可迅速启动和扩大对外界因素的免疫应答。目前关于其激活机制尚无定论,Söderhall等^[16]在研究淡水螯虾(*Astacus astacus*)中酚氧化酶原的激活机制时发现,由入侵异物

结构成分引发酶原激活与正常生理条件下酶原的“自发”激活属于完全不同的2种机制。另据报道^[17-18],环境变化以及低浓度的 Ca^{2+} 均能诱导酚氧化酶激活系统,使血淋巴酚氧化酶活力升高,由此推测甲壳动物的酚氧化酶原激活系统可能存在多种激活机制。

Victor等^[19]认为,在汞的胁迫下淡水沼虾(*Macrobrachium idae*)循环血细胞数量减少是因为血细胞在鳃中的流动受到抑制造成的;丁美丽等^[1]研究表明,有机污染导致水环境中氨氮浓度增加,会引起中国对虾鳃、肝胰腺、中肠粘膜等组织病变。本研究表明,随着氨氮浓度的升高,酚氧化酶活力逐渐增大,溶菌和抗菌活力逐渐减少,由此认为水环境中氨氮浓度升高,会损伤鳃的结构,影响对虾呼吸、离子调节($\text{NH}_4^+/\text{Na}^+$)和氮代谢等相关生理功能。因受到这些刺激的影响,对虾产生一系列应激反应,耗氧量提高,能量需求增加,而氧合血蓝蛋白浓度降低导致氧的传输能力下降、能量供给减少。在这种情况下,对虾便通过厌氧呼吸来补充能量,同时产生乳酸盐,破坏血淋巴的酸碱平衡,导致血淋巴pH升高,引发呼吸性碱中毒,从而影响血淋巴中的生物合成过程。由此推测对虾因氨氮刺激,对虾启动半颗粒细胞可能经脱颗粒或自溶,激活酚氧化酶原系统,引起血清中酚氧化酶活力升高;同时由于血淋巴中某些生物合成机制被破坏或血细胞自溶后某些细胞组分可能变成异物,需要消耗免疫因子,导致血细胞数量减少,溶菌和抗菌活力下降。目前有关甲壳动物环境免疫学机制的研究很少,在这方面尚需进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 丁美丽,林 林,李光友,等.有机污染对中国对虾体内外环境影响的研究[J].海洋与湖沼,1997,28(1):7-12.
- [2] Chen J C, Lin C Y. Oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Penaeus chinensis* juveniles exposed to ambient ammonia at different salinity levels[J]. Comp Biochem Physiol, 1992, 102C:287-291.
- [3] Chen J C, Nan F H. Effect of ambient ammonia on ammonia-N excretion and ATPase activity of *Penaeus chinensis*[J]. Aquat Toxic, 1992, 23:1-10.
- [4] 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.
- [5] Cheng W, Chen S M, Wang F I, et al. Effects of temperature, pH, salinity and ammonia on the phagocytic activity and clearance efficiency of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*

- to *Lactococcus garvieae* [J]. *Aquaculture*, 2003, 219: 111 – 121.
- [6] Liu C H, Chen J C. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* [J]. *Fish Shellf Immunol*, 2004, 16: 321 – 334.
- [7] Ashida M. Purification and characterization of pro-phenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori* [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1971, 144: 749 – 762.
- [8] Hultmark D, Steiner H, Rasmussen T, et al. Insect immunity: purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur J Biochem*, 1980, 106: 7 – 16.
- [9] Chen J C, Lin J N. Oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Penaeus chinensis* juveniles exposed to ambient ammonia at different salinity levels [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1992, 102C: 287 – 291.
- [10] Chen J C, Cheng S Y, Chen C T, et al. Changes of oxyhemocyanin, protein and free amino acid levels in the hemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1994, 109A: 339 – 347.
- [11] Racotta I S, Roberto H H. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2000, 125A: 437 – 443.
- [12] Chen J C, Kou Y Z. Accumulation of ammonia in the haemolymph of *Penaeus monodon* exposed to ambient ammonia [J]. *Aquaculture*, 1993, 109: 177 – 185.
- [13] Chen J M, Chen J C. Study on the free amino acid levels in the hemolymph, gill, hepatopancreas and muscle of *Penaeus monodon* exposed to elevated ambient ammonia [J]. *Aquatic Toxicology*, 2000, 50: 27 – 37.
- [14] Le Moullac G, Haffner P. Environmental factors affecting immune responses in crustacea [J]. *Aquaculture*, 2000, 191: 121 – 131.
- [15] Cheng W, Chen J C. The virulence of *Enterococcus* to freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its immune resistance under ammonia stress [J]. *Fish Shellf Immunol*, 2002, 12: 97 – 109.
- [16] Söderhall K, Unestam T. Activation of crayfish serum phenoloxidase: The specificity of cell wall glucan activation and activation by purified fungal glycoproteins [J]. *Can J Microbiol*, 1979, 25: 406 – 414.
- [17] 潘鲁青, 姜令绪. 盐度、pH 突变对 2 种养殖对虾免疫力的影响 [J]. *青岛海洋大学学报*, 2002, 32(6): 903 – 910.
- [18] Gollas-Galván T, Hernández-López J, Vargas-Albore F. Effect of calcium on the prophenoloxidase system activation of the brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes) [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1997, 117A: 419 – 425.
- [19] Victor B, Narayanan M, Jones Nelson D, et al. Gill pathology and hemocyte response in mercury exposed *Macrobrachium idea* Heller [J]. *Environmental Biology*, 1990, 11: 61 – 65.

Effects of ammonia-N on immune parameters of white shrimp *Litopenaeus vannamei*

JIANG Ling-xu, PAN Lu-qing, XIAO Guo-qiang

(Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: An important environmental concern associated with intensive shrimp culture is the production of ammonia, which is formed through ammonification of organic matter like unconsumed food and feces. During the shrimp culture processes, the level of ammonia in water will increase suddenly for the death of the dominant population of phytoplankton and the accumulation of unconsumed food and feces. High levels of ammonia can affect the survival and growth, respiration, hemolymph osmotic pressure in shrimp, and even cause mortality. Effect of ammonia has been reported to reduce total haemocyte count (THC) of crustaceans and lead to an enhanced sensitivity to pathogens. This paper studies effect of ammonia on immune parameters of *Litopenaeus vannamei*, analyzes the changes of different immune parameters under different ammonia levels within 48 h, and aims to discuss the mechanism of the shrimp immunological regulation and also provides a scientific basis for water quality regulation in shrimp culture.

Adults *L. vannamei* were obtained from commercial farms in Yinghai and Qingdao. The body length of healthy shrimp is (8.5 ± 0.5) cm, with no significant difference among various treatments. These shrimps were acclimated in tanks (30 cm × 40 cm × 50 cm) containing aerated water (salinity 30, pH 8.0) with an air-lift for 8 to 10 d prior to experimentation in the laboratory at (23 ± 0.5) °C. The water in each tank was re-

newed twice daily by 1/2 volume. During the acclimation period, the shrimps were fed a formulated shrimp diet daily. Before experiment the shrimp were stopped to feed for 48 h. Six ammonia-N levels of 0.05 (the control), 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 2.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ were designed using ammonium chloride solution of 4 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ to adjust. During the experiment, ammonia levels were measured every 4 h and varied at (0.12 ± 0.05) , (0.53 ± 0.02) , (1.08 ± 0.10) , (1.48 ± 0.05) , (2.06 ± 0.07) and (2.58 ± 0.04) mg/L , respectively, and no shrimps died. For each treatment, there were three triplicate groups. Three shrimps were sampled randomly from each group at the time intervals of 0, 4, 8, 12, 24 and 48 h, respectively.

The results indicate that ammonia-N has significant effects on THC, phenoloxidase, bacteriolytic and antibacterial activities in haemolymph ($F > F_{0.05}$) of shrimp. As ammonia-N concentration increases, the levels of THC, bacteriolytic and antibacterial activities decrease, while the phenoloxidase activity increases gradually. As the time of sampling increases, the levels of THC, bacteriolytic and antibacterial activities decrease, while the phenoloxidase activity in the haemolymph increases gradually in all groups except the control. All the immune parameters remain at a constant level after 24 h. It is considered that after the increase of ammonia levels, the emergency reaction lead to decompensation and decrease of immune capacity and increase of sensitivity to pathogen in shrimps. Therefore, during *L. vannamei* culture periods it is necessary to take useful measures to reduce ammonia levels if ammonia-N concentration exceeds 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Key words: ammonia-N; *Litopenaeus vannamei*; haemocyte count; phenoloxidase activity; bacteriolytic activity; antibacterial activity

Corresponding author: PAN Lu-qing. E-mail: panlq@ouc.edu.cn

2005 年度《现代渔业信息》征订启事

《现代渔业信息》是农业部主管、中国水产科学研究院东海水产研究所主办和农业部东海区渔政渔港监督管理局、农业部黄渤海区渔政渔港监督管理局、江苏省海洋与渔业局等 47 个单位协办的供全国农、林、水系统各级领导、高等院校教师、科技人员以及生产单位工作者参阅的渔业科技综合性信息刊物。

本刊被评为全国水产系统和上海市优秀刊物,1993 年被美国收入国际期刊名录。本刊报道的主要内容侧重于国外渔业生产、水产科学技术的新动态、新工艺、新材料和新方法等信息;同时报道国内渔业生产、科技及教育等方面进展动态。为各级领导、科研人员及时了解国内外渔业发展动态、掌握水产科学发展趋势,领导正确决策、科研人员开阔思路、院校教师更新教材以及生产单位技术改造、引入竞争机制等均有重要参考价值。

本刊为月刊,面向国内外公开发行,国际大 16 开本,每期定价 4 元,全年 48 元。国际标准刊号:ISSN1004-8340,国内统一刊号:CN31-1465/S。国内发行:上海市邮政局报刊发行,请读者到当地邮局办理订阅。若当地邮局订阅不便,仍可与《现代渔业信息》发行部联系办理订阅。编辑部地址:上海市军工路 300 号,邮政编码:200090,广告、发行部联系人:徐吟梅,联系电话:021-55530500,传真:021-65683926。

订阅帐号:上海工商银行杨树浦分理处,帐号 1001222309026400731,户名:东海水产研究所。