

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170907001

http://www.yykxjz.cn/

彭军辉, 陈丽英, 程长洪, 冯娟, 马红玲, 郭志勋. 氨氮对拟穴青蟹的急性毒性及对其血清免疫相关酶活力的影响. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 114–121

Peng JH, Chen LY, Cheng CH, Feng J, Ma HL, Guo ZX. Acute toxicity of ammonia nitrogen to *Scylla paramamosain* and its influence on immune factors in serum. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 114–121

## 氨氮对拟穴青蟹的急性毒性 及其血清免疫相关酶活力的影响\*

彭军辉<sup>1,2</sup> 陈丽英<sup>3</sup> 程长洪<sup>1</sup> 冯娟<sup>1</sup> 马红玲<sup>1</sup> 郭志勋<sup>1①</sup>

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所 农业农村部水产品加工重点实验室 广州 510300;

2. 水产科学国家级实验教学示范中心 上海海洋大学 上海 210306; 3. 广州大学生命科学学院 广州 510006)

**摘要** 采用静水法研究氨氮对拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)的急性毒性及在氨氮初始浓度分别为 0(C0, 对照组)、10(C10 组)、20(C20 组)、30(C30 组)、40(C40 组)、50 mg/L(C50 组), 胁迫时间分别为 0、6、24、48、72 h 的条件下对其血清中碱性磷酸酶(AKP)、酸性磷酸酶(ACP)、溶菌酶(LZM)、超氧化物歧化酶(SOD)和酚氧化酶(PO)活力的影响。结果显示, 总氨氮对拟穴青蟹 24 h 和 48 h 的半致死浓度分别为 104.793、66.124 mg/L, 安全浓度为 7.90 mg/L, 非离子氨对拟穴青蟹 24 h 和 48 h 的半致死浓度分别为 8.396、5.298 mg/L, 安全浓度为 0.63 mg/L。在胁迫 6、24、48 与 72 h 时, 各实验组的 LZM 活力均显著低于对照组( $P < 0.01$ )。相较于对照组, C10、C20 及 C40 组在 24 h 的 AKP、ACP 活力均显著升高( $P < 0.05$ )。C20 组在 24 h 的 SOD 活力则显著低于其他胁迫时间点( $P < 0.05$ )。胁迫 72 h 时, C30、C40 及 C50 组的 PO 活力显著高于对照组( $P < 0.05$ )。该实验条件下, 不高于 40 mg/L 的氨氮可在 24 h 内使拟穴青蟹血清中的 AKP 与 ACP 活力显著升高, 而 50 mg/L 的氨氮则对其具有抑制作用; 各实验组浓度氨氮均在 72 h 内对拟穴青蟹血清中的 LZM 活力具有显著的抑制作用, 对 PO 活力具有明显的刺激作用, 对 SOD 活力无显著影响。

**关键词** 拟穴青蟹; 氨氮; 安全浓度; 免疫酶活

**中图分类号** X503.225 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)05-0114-08

拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)俗称青蟹, 具有生长迅速、肉鲜味美、营养价值高等特点, 是我国东南沿海地区重要的养殖蟹类之一, 2016 年我国青蟹养殖总产量达到了 15 万 t(2017 中国渔业统计年鉴)。

但随着青蟹养殖业的迅猛发展, 其养殖水质不断恶化, 致使一些有害的环境因子激增, 从而导致青蟹病害频发, 严重威胁青蟹养殖业的健康发展(张迪等, 2013)。氨氮是养殖水体中一种重要的污染因子, 其

\* 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2016TS32)、广东省海洋渔业科技与产业发展专项科技攻关与研发项目(A201501B04)、广东省渔港建设和渔业发展专项资金鱼病防治项目(2016-11)和广东省科技计划项目(2013B090300009)共同资助 [This work was supported by Central Level Public Welfare Special Funds for Basic Research and Business Expenses of Scientific Research Institutions (2016TS32); Special Scientific Research and Development Projects for Marine Fishery Science and Technology and Industry Development of Guangdong Province (A201501B04); Fishing Port Construction and Fishery Development Special Funds for Fish Disease Prevention and Control of Guangdong Province (2016-11); Science and Technology Program Project of Guangdong Province (2013B090300009)]. 彭军辉, E-mail: pengjhpeng@163.com

① 通讯作者: 郭志勋, 研究员, E-mail: guozhixun1@163.com

收稿日期: 2017-09-07, 收修改稿日期: 2017-10-22

对养殖水生动物的生长代谢及非特异性免疫功能等具有严重影响(Racotta *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2007; 王芸等, 2013; 邓康裕等, 2015)。研究表明, 在 30 d 的慢性氨氮胁迫下, 吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)幼鱼的增重率(WGR)和特定生长率(SGR)随着氨氮浓度的升高而降低(肖炜等, 2015)。奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus*×*O. areus*)幼鱼在低浓度氨氮胁迫 24 h 后, 其肝脏的过氧化氢酶(CAT)活力显著下降( $P<0.05$ )(韩春艳等, 2014)。而青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)和刺参(*Apostichopus japonicus*)等水产养殖动物的组织器官及部分免疫酶活也会在长时间的氨氮胁迫下受到不同程度的损伤及抑制作用(胡毅等, 2012; 张武肖等, 2015; 刘洪展等, 2012)。另外, 细角滨对虾(*Litopenaeus stylirostris*)对氨氮的耐受力会随着胁迫时间的延长不断降低, 其死亡率会显著升高(Mugnier *et al.*, 2008)。而中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)的血细胞总数和吞噬能力、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)的血细胞数量及酚氧化酶原活力等也会随着氨氮浓度的升高而降低(黄鹤忠等, 2006; 岳峰等, 2010)。此外, 一些虾蟹类体内的腺苷三磷酸酶(ATPase)、溶菌酶(LZM)、谷胱甘肽合成酶(GPX)等也会因氨氮胁迫而受到不同程度的影响, 而使其正常生长代谢受到严重威胁(艾春香等, 2011; 洪美玲等, 2007; 曾媛媛等, 2011; Wang *et al.*, 2004)。

该实验主要研究氨氮对拟穴青蟹的急性毒性及对其血清中碱性磷酸酶(AKP)、酸性磷酸酶(ACP)、溶菌酶(LZM)、超氧化物歧化酶(SOD)和酚氧化酶(PO)活力的影响, 以期探究养殖水体中的氨氮对拟穴青蟹的毒理作用及对其免疫机能的影响, 为青蟹的健康养殖提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用青蟹购自江门市, 选取活力旺盛、体色正常的健康青蟹, 平均体重为(29.41±4.12) g, 平均壳长为(52.09±2.26) mm, 平均壳宽为(37.40±2.28) mm。于直径 0.8 m、高 1.2 m 的圆柱形塑料桶中暂养 7 d, 每缸 10~15 只青蟹, 海水盐度为 14.62±1.08, 温度为(27.17±0.14)℃, 溶氧为(5.38±0.35) mg/L, pH 为 8.16±0.06。暂养期间连续充氧, 每天投喂新鲜方形马珂蛤(*Mactra veneriformis*) 1 次并及时清理食物残渣和排泄物, 每天换水 1 次, 换水量为总水体的 50%, 暂养阶段未见青蟹有蜕壳现象。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 急性毒性实验** 以分析纯 NH<sub>4</sub>Cl 为氨氮源, 配制成浓度为 4 g/L 的母液, 根据实验要求, 再将母液稀释为 40、60、80、100、120 和 140 mg/L 的 6 个梯度, 每个梯度设 3 个平行, 每个平行 10 只蟹, 实验期间不投饵, 每天用相应氨氮浓度的海水换水, 换水量为总水体的 50%, 及时清理青蟹排泄物。实验期间密切观察青蟹活动, 详细记录 48 h 内的死亡个体数, 并及时清理死亡青蟹。

根据实验结果, 以直线内插法求出 24 h 和 48 h 的半致死浓度(Median lethal concentration) LC<sub>50</sub>, 根据 Turubell 公式(黄鹤忠等, 1998)求出其安全浓度(Safe concentration):

$$SC=(48\text{ h LC}_{50}\times 0.3)/(24\text{ h LC}_{50}/48\text{ h LC}_{50})^2$$

并根据以下公式计算所对应的非离子氨的浓度:

$$C_{\text{NH}_3}=C_{\text{NH}_3\text{-N}}/(10^{\text{pK}_{\text{a}}\text{S,T}}\text{-pH}+1) \quad (1)$$

$$\text{pK}_{\text{a}}\text{S,T}=9.24+0.003091\text{S}+0.0324(298\text{-T}) \quad (2)$$

(1)、(2)式中, C<sub>NH<sub>3</sub>-N</sub> 表示水体总氨氮浓度, T 表示绝对温度( $T=273^\circ\text{C}+t$ ), t 为摄氏温度, S 为盐度, pK<sub>a</sub>S,T 为电离常数, pH 为水体 pH 值(钱佳慧等, 2016)。

**1.2.2 血清免疫相关酶实验** 免疫相关酶实验所设氨氮浓度分别为 0(C0 组, 对照组)、10(C10 组)、20(C20 组)、30(C30 组)、40(C40 组)和 50 mg/L(C50 组), 每个浓度设 3 个平行, 每个平行 15 只蟹, 在氨氮胁迫 0、6、24、48 与 72 h 时采血。采血时, 每个平行组随机选取 8 只蟹, 用 1 ml 的一次性注射器从青蟹的第 3 步足基关节处抽取 150~200 μl 血液, 并将其混匀收集于 2 ml 的 EP 管中, 4℃、8000 r/min 离心 10 min, 再用移液枪抽取上层血清分装到 1.5 ml 的离心管中, 于-20℃保存备用。采完血的青蟹, 用酒精棉球擦拭采血部位并放回原组。

青蟹血清 PO 活力的测定采用改进的 Ashida (1971)方法进行测定, 血清中的 ACP、AKP、LZM、SOD 的测定则采用南京建成生物试剂盒, 参照厂家提供的说明书进行测定。

**1.2.3 数据处理** 实验数据结果以平均值±标准差(Mean±SD)表示, 使用 SPSS 18.0 软件对数据进行统计分析, 并采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和 Duncan 法进行多重比较, 取  $P<0.05$  为显著性差异水平,  $P<0.01$  为极显著性差异水平。

## 2 结果

### 2.1 急性毒性

该实验条件下, 对照组青蟹未出现死亡(表 1)。

在实验组中,同一胁迫时间下,随着氨氮浓度的升高,青蟹的死亡率不断增高;而在同一氨氮浓度下,随着胁迫时间的延长,青蟹的死亡率也在不断升高,在胁迫时间为 48 h、氨氮浓度为 120 mg/L 及以上时青蟹的死亡率达到 100%。

表 1 氨氮对拟穴青蟹急性毒性实验  
Tab.1 The acute toxicity test of ammonia nitrogen on *S. paramamosain*

氨氮浓度 Concentration of ammonia-N (mg/L)	死亡率 Mortality rate (%)	
	24 h	48 h
对照组(Control group, <0.02)	0	0
40.00	3.33±0.058	23.33±0.058
60.00	26.67±0.115	43.33±0.115
80.00	33.33±0.208	66.67±0.153
100.00	40.00±0.346	83.33±0.153
120.00	60.00±0.265	100
140.00	76.67±0.153	100

经线性回归分析(图 1),氨氮对青蟹 24、48 h 的 LC<sub>50</sub> 分别为 104.793、66.124 mg/L, SC 为 7.90 mg/L。并由公式(1)、(2)计算,得非离子氨对青蟹 24、48 h 的 LC<sub>50</sub> 分别为 8.396、5.298 mg/L, SC 为 0.63 mg/L。

2.2 血清免疫相关酶实验结果

如图 2 所示,对照组(C0)的 PO 活力随时间无显著变化;与对照组相比,C10、C20 组的 PO 活力随胁迫时间先上升后下降,而 C30、C40 及 C50 组的 PO 活力则随胁迫时间先下降后上升;其中,C10 组

在 24 h 显著高于对照组( $P<0.05$ ), C30、C40 及 C50 组在 72 h 显著高于对照组( $P<0.05$ ),且 C40 组与对照组有极显著差异( $P<0.01$ )。

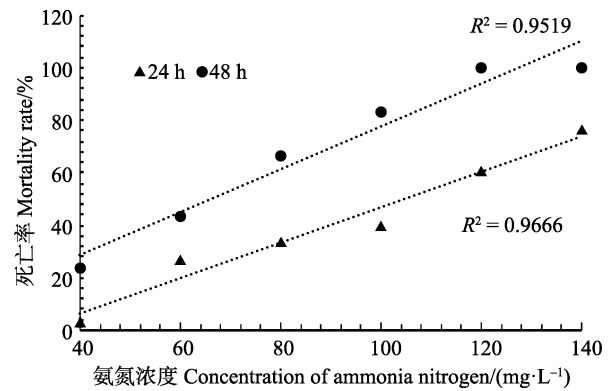


图 1 氨氮对拟穴青蟹急性毒性  
Fig.1 The acute toxicity of ammonia nitrogen on *S. paramamosain*

由图 3 可知,C10、C20、C40 组的 AKP 活力均在胁迫 24 h 达到最高水平,且与对照组(C0)差异显著( $P<0.05$ ),之后持续下降,至 72 h 又再次升高;C30 组的 AKP 活力则在胁迫 72 h 达到最高水平,且显著高于 C10 和 C50 组( $P<0.05$ );C50 组的 AKP 活力则随胁迫时间先下降后上升,且一直低于对照组水平(除 48 h 外)。

如图 4 所示,对照组(C0)的 ACP 活力随时间无显著变化;与对照组相比,各实验组 ACP 活力均随胁迫时间先上升后下降,至 72 h 又趋于对照组水平,其中,C10、C20 及 C40 组的 ACP 活力在 24 h 达

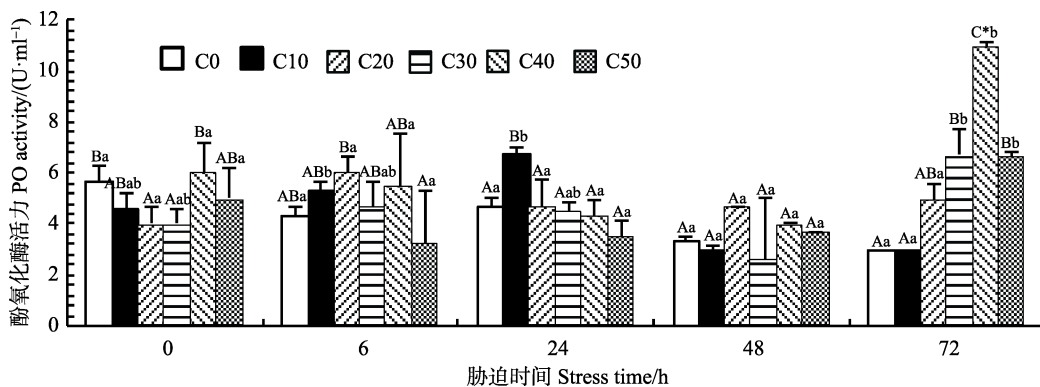


图 2 氨氮对拟穴青蟹血清 PO 活力的影响  
Fig.2 Effects of ammonia nitrogen on PO activity in serum of *S. paramamosain*

图中大写字母表示同一胁迫时间点各组间差异,小写字母表示同组内各胁迫时间点差异,其中,相同字母间表示差异不显著,不同字母间表示差异显著( $P<0.05$ ),“\*”表示同一时间点对照组与实验组差异极显著( $P<0.01$ ),下同

Capital letters in the figure represent differences between groups at the same stress time, the lowercase indicate the difference of the stress time in the same group, among which the same letters indicate no significant difference, but the different letters indicate significant difference ( $P<0.05$ ), “\*” indicates highly significant difference between the control group and test groups at the same stress time, the same below

到最高水平( $P<0.05$ ), 且在 24 h 显著高于对照组( $P<0.05$ ), 而 C50 组的 ACP 活力则在 24 h 显著低于对照组及其他各实验组( $P<0.05$ )。

由图 5 可知, 与对照组(C0)相比, 各实验组的

LZM 活力随着胁迫时间的延长而不断降低, 在胁迫 6、24、48 和 72 h 时的 LZM 活力均显著低于 0 h ( $P<0.05$ ), 且在上述时间段内各实验组的 LZM 活力均极显著低于对照组( $P<0.01$ )。

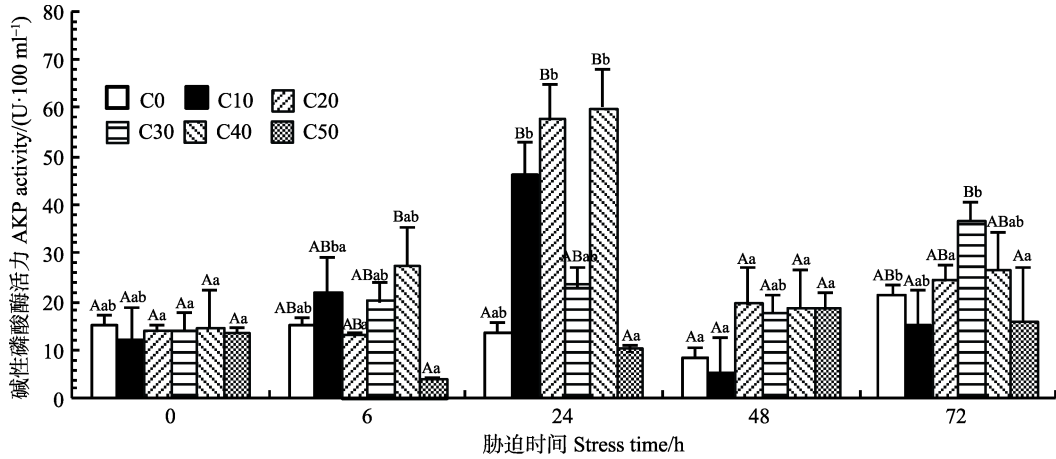


图 3 氨氮对拟穴青蟹血清 AKP 活力的影响

Fig.3 Effects of ammonia nitrogen on AKP activity in serum of *S. paramamosain*

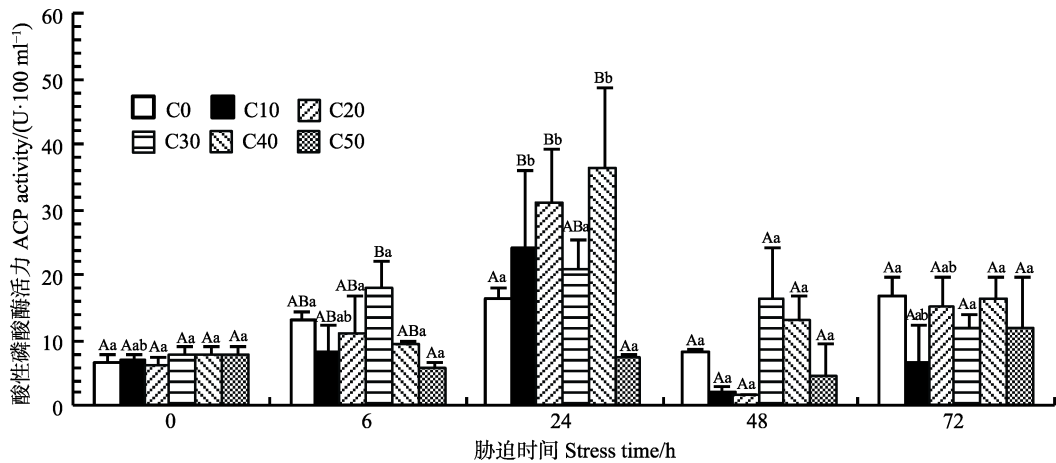


图 4 氨氮对拟穴青蟹血清 ACP 活力的影响

Fig.4 Effects of ammonia nitrogen on ACP activity in serum of *S. paramamosain*

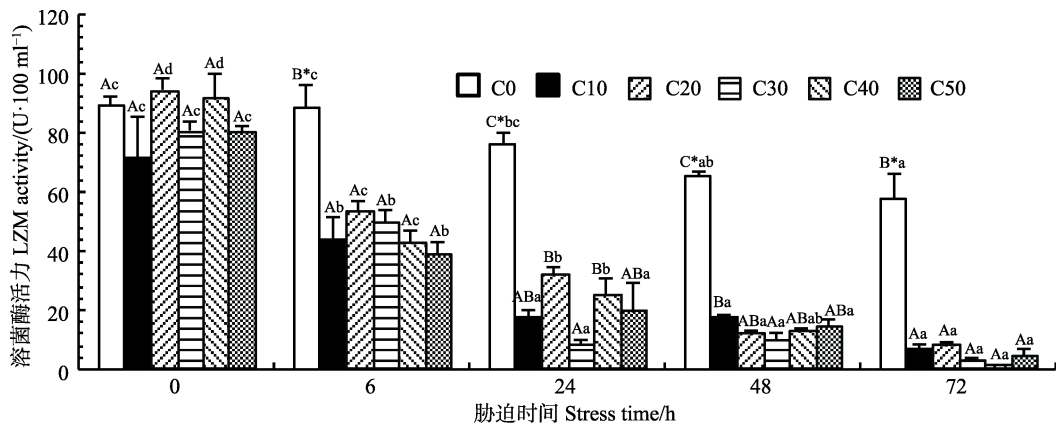


图 5 氨氮对拟穴青蟹血清 LZM 活力的影响

Fig.5 Effects of ammonia nitrogen on LZM activity in serum of *S. paramamosain*

如图 6 所示, 对照组(C0)的 SOD 活力随胁迫时间无显著变化; 与对照组相比, 除 C20 组在 24 h 的

SOD 活力显著低于其他胁迫时间点( $P<0.05$ ), 其余各组的 SOD 活力在胁迫周期内无显著变化。

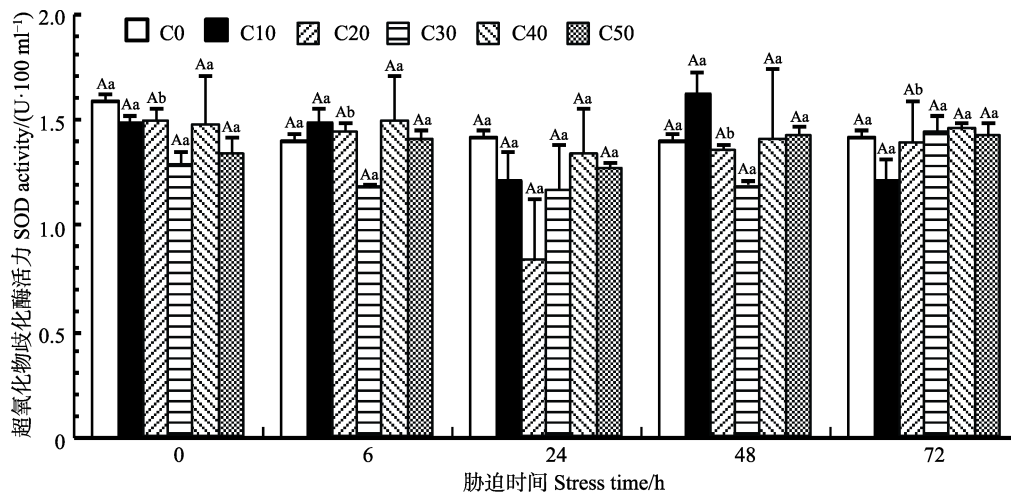


图 6 氨氮对拟穴青蟹血清 SOD 活力的影响

Fig.6 Effects of ammonia nitrogen on SOD activity in serum of *S. paramamosain*

### 3 讨论

养殖水体中的氨氮分为离子氨和非离子氨, 能降低机体的血液载氧能力而引起机体中毒, 对机体的免疫系统具有一定的损伤作用(董玉波等, 2011)。邵鑫斌等(2011)报道, 在水体盐度为 30.6、pH 为  $8\pm 1$  的条件下, 当氨氮浓度为 100 mg/L、胁迫 24 h 后锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 开始出现死亡, 死亡率为 10%。本研究结果显示, 在氨氮浓度为 40 mg/L、胁迫 24 h 后青蟹即开始出现死亡; 而当氨氮浓度为 100 mg/L 时、胁迫 24 h 后青蟹的死亡率达到 40%。当水体的总氨氮浓度及其他条件不变时, 非离子氨的浓度与盐度成反比。由于该实验所设水体盐度低于上述报道的盐度, 故在相同氨氮浓度(100 mg/L)下, 其所含非离子氨的浓度(8.012 mg/L)比上述水体的非离子氨浓度(3.568 mg/L)更高, 而相同浓度下的非离子氨比离子氨对机体具有更强的毒性(Ruyet *et al*, 1995), 因此, 该实验青蟹的死亡率也更高。本研究结果还显示, 氨氮对青蟹的 SC 为 7.90 mg/L, 高于其对团头鲂(SC=5.649 mg/L)和墨吉明对虾(SC=3.531 mg/L)的安全浓度(张武肖, 2015; 钱佳慧等, 2016)。可见, 与鱼虾相比, 青蟹对氨氮具有一定的耐受性。

PO 受酚氧化酶原(Prophenoloxidase, proPO)激活系统调控, 在甲壳动物体内发挥着重要的免疫防御作用(Ashida *et al*, 1984)。研究表明, 氨氮胁迫凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)可使其 24 h 内的血清 PO 活力明显上升(Le Moullac *et al*, 2000); 以 20 mg/L 的氨

氮处理三疣梭子蟹, 其酚氧化酶原活力在 6 h 后显著低于对照组, 但其酚氧化酶原 mRNA 的表达量却显著高于对照组(Yue *et al*, 2010)。该结果显示, C10、C20 组可分别使青蟹的 PO 活力在 24 h 和 6 h 明显升高, C30、C40 及 C50 组可使其 PO 活力在 72 h 显著升高( $P<0.05$ ), 表明各实验组氨氮在胁迫周期内对青蟹血清中的 PO 活力有明显的促进作用( $P<0.05$ )。

AKP 和 ACP 是水解酶体系的重要组成部分, AKP 能将磷酸基团转移到底物分子上, 在磷化物的消化与吸收中起着重要作用, 同时, 也参与机体的解毒过程; 而 ACP 能增强血细胞对异物的识别和吞噬作用, 是机体杀灭病原体的物质基础(何海琪等, 1992)。艾春香等(2011)研究发现, 10 mg/L 组的拟穴青蟹鳃中的 AKP、ACP 比活力在 72 h 达到最高水平, 之后持续下降; 40 mg/L 组的 AKP 比活力在胁迫周期内一直低于对照组水平。而本研究结果显示, C10、C20、和 C40 组的血清 AKP、ACP 活力在胁迫 24 h 即达到最高水平( $P<0.05$ ), 表现为急性促进作用, 之后开始显著下降。本结果与上述结果存在部分差异, 这可能是由于相较于鳃组织, 磷酸酶及其同工酶主要存在于血细胞的溶酶体中, 而氨氮可导致青蟹血细胞解体(艾春香等, 2011), 故上述浓度的氨氮可在短时间内使血清中的磷酸酶激增, 但随着胁迫时间的延长及氨氮浓度的升高(C50 组), 机体的结构可能受到不可逆的损伤, 以致其磷酸酶的活力受到抑制。

LZM 广泛存在于动植物及微生物的多种组织、体液和分泌物中, 能破坏革兰氏阳性细菌的细胞壁,

使其溶解而失去感染活性, 在生物体的非特异性免疫中起着重要作用(Grinde *et al.*, 1988)。王贞杰等(2017)发现, 氨氮胁迫可使圆斑星鲈(*Verasper variegatus*)的溶菌酶活力在 12~96 h 内持续下降, 且氨氮浓度越高, 酶活下降越快。凡纳滨对虾的溶菌酶活性也会因为氨氮胁迫而持续降低(Qiu *et al.*, 2008)。本研究结果表明, 氨氮对青蟹血清 LZM 的活力具有显著的抑制作用。Yue 等(2010)发现, 将三疣梭子蟹暴露在氨氮浓度为 20 mg/L 的水中, 其溶菌酶基因的表达量显著降低( $P < 0.05$ ), 由此说明, 氨氮可能是通过抑制机体中溶菌酶基因的正常表达而使 LZM 活力显著降低。

青蟹血细胞的吞噬过程会产生过氧化氢( $H_2O_2$ )和超氧阴离子自由基( $O_2^{\cdot-}$ )等氧化物质, 这些氧化物质除了具有杀菌作用外, 也会对自身细胞产生一定的损害作用(姚翠鸾等, 2003), 而 SOD 具有清除机体内这些氧化活性物质的作用, 使机体免于因氧化作用而产生损伤(孔祥会等, 2003)。本研究发现, 短时间的氨氮胁迫对甲壳动物血清中 SOD 活力影响并不显著。黄鹤忠等(2006)报道, 当氨氮浓度为 5.0 mg/L、胁迫 10 d 或 3.0~5.0 mg/L、胁迫 20 d 时, 中华绒螯蟹的 SOD 活性才有明显下降( $P < 0.05$ )。而经氨氮胁迫 4 d, 罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)的 SOD 活性显示为增高, 至 10 d 才表现为降低(王玥等, 2006)。由此可见, 长时间的氨氮胁迫才有可能导致机体结构的破坏, 致使其免疫系统受损, 从而导致 SOD 活力受到影响。

#### 4 结论

综上所述, 不同浓度氨氮在实验周期内对 SOD 活力无显著影响, 但其会通过急性促进 AKP、ACP 和 PO 或显著抑制 LZM 等酶活力的方式来影响拟穴青蟹的非特异性免疫反应, 且这种急性促进作用通常是血细胞受到破坏而产生的结果, 是不可逆的, 说明略高于安全浓度的氨氮( $\geq 10$  mg/L)即会对拟穴青蟹产生明显的毒害作用。因此, 该研究建议在拟穴青蟹养殖生产中, 要定时检测养殖水体中的氨氮含量并通过适时更换养殖用水等方式将氨氮控制在安全浓度( $C_{NH_3-N}$ , 7.90 mg/L;  $C_{NH_3}$ , 0.63 mg/L)以下, 从而为青蟹提供持续健康的养殖环境。

#### 参 考 文 献

Ai CX, Zeng YY. The effects of ammonia-N stress on the activities of ATPase, ACP and AKP in different tissues and organs of mud crab *Scylla paramamosain*. Journal of

Xiamen University (Natural Science), 2011, 50(4): 772-778 [艾春香, 曾媛媛. 氨氮胁迫对拟穴青蟹腺苷三磷酸酶和磷酸酶比活力的影响. 厦门大学学报(自然科学版), 2011, 50(4): 772-778]

Ashida M, Söderhäll K. The prophenoloxidase activating system in crayfish. Comparative Biochemistry and Physiology, 1984, 77B(1): 21-26

Ashida M. Purification and characterization of prophenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*. Archives of Biochemistry & Biophysics, 1971, 144(2): 749-762

Cheng W, Chen JC. The virulence of Enterococcus to freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its immune resistance under ammonia stress. Fish & Shellfish Immunology, 2002, 12(2): 97-109

Deng KY, Meng XH, Kong J, *et al.* Effects of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate on non-specific immunity and expression of immune gene under the ammonia stress of *Litopenaeus vannamei*. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(6): 71-78 [邓康裕, 孟宪红, 孔杰, 等. 聚- $\beta$ -羟基丁酸酯对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)非特异性免疫力及氨氮胁迫后免疫基因表达量的影响. 渔业科学进展, 2015, 36(6): 71-78]

Dong YB, Wang K, Wang LT. Research progress in toxicity of ammonia nitrogen to aquatic organisms. Tianjin Fisheries, 2011(Z1): 8-13 [董玉波, 王轲, 王林同. 氨氮对水生生物毒性的研究进展. 天津水产, 2011(Z1): 8-13]

Grinde B, Jollés J, Jollés P. Purification and characterization of two lysozymes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). European Journal of Biochemistry, 1988, 173: 269-273

Han CY, Zheng QM, Chen GD, *et al.* Effect of ammonia-N stress on non-specific immunity of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). South China Fisheries Science, 2014(3): 47-52 [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. 南方水产科学, 2014(3): 47-52]

He HQ, Sun F. Research on acidic and alkaline phosphatase characteristics of *Penaeus chinensis*. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1992, 23(5): 555-560 [何海琪, 孙凤. 中国对虾酸性和碱性磷酸酶的特性研究. 海洋与湖沼, 1992, 23(5): 555-560]

Hong M, Chen L, Sun X, *et al.* Metabolic and immune responses in Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) juveniles exposed to elevated ambient ammonia. Comparative Biochemistry & Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology, 2007, 145(3): 363-369

Hong ML, Chen LQ, Gu SZ, *et al.* Effects of ammonia exposure on immunity indicators of haemolymph and histological structure of hepatopancreas in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(3): 412-418 [洪美玲, 陈立侨, 顾顺樟, 等. 氨氮胁迫对中华绒螯蟹免疫指标及肝胰腺组织结构的影响. 中国水产科学, 2007, 14(3): 412-418]

Hu Y, Huang Y, Zhong L, *et al.* Effects of ammonia stress on the

- gill  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, microstructure and some serum physiological-biochemical indices of juvenile black carp (*Mylopharyngodon piceus*). Journal of Fisheries of China, 2012, 36(4): 538–545 [胡毅, 黄云, 钟蕾, 等. 氨氮胁迫对青鱼幼鱼鳃丝  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶、组织结构及血清部分生理生化指标的影响. 水产学报, 2012, 36(4): 538–545]
- Huang HZ, Li Y, Song XH, *et al.*  $\text{NH}_4^+$ -N stress on immune function of *Eriocheir sinensis*. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2006, 37(3): 198–205 [黄鹤忠, 李义, 宋学宏, 等. 氨氮胁迫对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)免疫功能的影响. 海洋与湖沼, 2006, 37(3): 198–205]
- Huang HZ, Liang SR. Toxicity treatment of 3 kinds of drugs on *Eriocheir sinensis* larvae. Reservoir Fisheries, 1998(6): 15–16 [黄鹤忠, 梁守仁. 3 种药物对河蟹幼体的毒性试验. 水生生态学杂志, 1998(6): 15–16]
- Kong XH, Wang GZ, Ai CX, *et al.* Comparative research on total antioxidant capacity and SOD activity in different organs and tissues in *Scylla serrata*. Journal of Applied Oceanography, 2003, 22(4): 469–474 [孔祥会, 王桂忠, 艾春香, 等. 锯缘青蟹不同器官组织中总抗氧化能力和 SOD 活性的比较研究. 应用海洋学学报, 2003, 22(4): 469–474]
- Le Moullac G, Haffner P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. Aquaculture, 2000, 191: 121–131
- Liu HZ, Zheng FR, Sun XQ, *et al.* Effect of exposure to ammonia nitrogen stress on immune enzyme of holothurian *Apostichopus japonicus*. Marine Science, 2012, 36(8): 47–52 [刘洪展, 郑风荣, 孙修勤, 等. 氨氮胁迫对刺参几种免疫酶活性的影响. 海洋科学, 2012, 36(8): 47–52]
- Mugnier C, Zipper E, Goarant C, *et al.* Combined effect of exposure to ammonia and hypoxia on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* survival and physiological response in relation to molt stage. Aquaculture, 2008, 274(2–4): 398–407
- Qian JH, Li ZM, Liu JY, *et al.* Acute toxicity of ammonia-N and its effect on the immune parameters of *Fenneropenaeus merguensis*. Journal of Applied Oceanography, 2016, 35(2): 211–216 [钱佳慧, 栗志民, 刘建勇, 等. 氨氮对墨吉明对虾的急性毒性及对其免疫因子的影响. 应用海洋学学报, 2016, 35(2): 211–216]
- Qiu DQ, Zhou XJ, Qiu MS, *et al.* Research on anti-disease ability of *Litopenaeus vannamei* and the biological control of *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophage under stresses of ammonia nitrogen. Acta Hydrobiologica Sinica, 2008, 32(4): 455–461 [邱德全, 周鲜娇, 邱明生. 氨氮胁迫下凡纳滨对虾抗病力和副溶血弧菌噬菌体防病效果研究. 水生生物学学报, 2008, 32(4): 455–461]
- Racotta IS, Hernándezherrerera R. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. Comparative Biochemistry & Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2000, 125(4): 437–443
- Ruyet PL, Chartois H, Quemener L. Comparative acute ammonia toxicity in marine fish and plasma ammonia response. Aquaculture, 1995, 136(1–2): 181–194
- Shao XB, Lü YL, Li K, *et al.* The acute toxicity of ammonia nitrogen to *Scylla serrata*, and the effects of temperature to the rate of oxygen consumption and suffocation point. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science), 2011, 30(6): 511–514 [邵鑫斌, 吕永林, 李凯, 等. 氨氮对锯缘青蟹的急性毒性和温度对其耗氧率、窒息点的影响. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2011, 30(6): 511–514]
- Wang WN, Wang AL, Zhang YJ, *et al.* Effects of nitrite on lethal and immune response of *Macrobrachium nipponense*. Aquaculture, 2004, 232(1): 679–686
- Wang Y, Hu YB, Jiang NC. Effect of ammonia nitrogen and nitrite nitrogen on immune enzymes of *Macrobrachium rosenbergii*. Journal of Zhejiang University (Science Edition), 2005, 32(6): 698–705 [王玥, 胡义波, 姜乃澄. 氨态氮、亚硝态氮对罗氏沼虾免疫相关酶类的影响. 浙江大学学报(理学版), 2005, 32(6): 698–705]
- Wang Y, Li J, Zhang Z, *et al.* Effect of pH and ammonia-N stresses on HSP90 gene expression of *Fenneropenaeus chinensis*. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34(5): 43–50 [王芸, 李健, 张喆, 等. pH、氨氮胁迫对中国对虾 HSP90 基因表达的影响. 渔业科学进展, 2013, 34(5): 43–50]
- Wang ZJ, Chen SQ, Cao DZ, *et al.* Effects of acute ammonia nitrogen stress on histopathology of gill and liver and enzyme activities of juvenile *Verasper variegatus*. Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(2): 61–69 [王贞杰, 陈四清, 曹栋正, 等. 急性氨氮胁迫对罗氏星斑 (*Verasper variegatus*) 幼鱼鳃和肝组织结构及相关酶活性的影响. 渔业科学进展, 2017, 38(2): 61–69]
- Xiao W, Li DY, Xu Y, *et al.* Effects of chronic external ammonia stress on growth, immunity and metabolism of juvenile GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*). South China Fisheries Science, 2015, 11(4): 81–87 [肖炜, 李大宇, 徐杨, 等. 慢性氨氮胁迫对吉富罗非鱼幼鱼生长、免疫及代谢的影响. 南方水产科学, 2015, 11(4): 81–87]
- Yao CL, Wang WN, Wang AL. Research progress of superoxide dismutase in aquatic animals. Marine Science, 2003, 27(10): 18–21 [姚翠鸾, 王维娜, 王安利. 水生动物体内超氧化物歧化酶的研究进展. 海洋科学, 2003, 27(10): 18–21]
- Yue F, Pan LQ, Xie P, *et al.* Effects of ammonia exposure on prophenoloxidase system and immune parameters of swimming crab *Portunus trituberculatus*. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(4): 761–770 [岳峰, 潘鲁青, 谢鹏, 等. 氨氮胁迫对三疣梭子蟹酚氧化酶原系统和免疫指标的影响. 中国水产科学, 2010, 17(4): 761–770]
- Yue F, Pan LQ, Xie P, *et al.* Immune responses and expression of immune-related genes in swimming crab *Portunus trituberculatus* exposed to elevated ambient ammonia-N stress. Comparative Biochemistry & Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2010, 157(3): 246–251

Zeng YY, Jiang YX, Ai CX. Effects of ammonia-N stress on the activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in different tissues and organs of *Scylla paramamosain*. *Journal of Applied Oceanography*, 2011, 30(2): 210–215 [曾媛媛, 蒋云霞, 艾春香. 氨氮胁迫对拟穴青蟹组织器官中SOD及GPX活性的影响. *应用海洋学学报*, 2011, 30(2): 210–215]

Zhang D, Yang K, Su YL, *et al.* A duplex nested-PCR assay for detection of mud crab reovirus and mud crab dicistrovirus-1. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(4): 808–815

[张迪, 杨铿, 苏友禄, 等. 青蟹呼肠孤病毒和青蟹双顺反子病毒-1 双重巢式 PCR 检测方法的建立. *中国水产科学*, 2013, 20(4): 808–815]

Zhang WX, Sun SM, Ge XP, *et al.* Acute effects of ammonia exposure on histopathology of gill, liver and kidney in juvenile *Megalobrama amblycephala* and the post-exposure recovery. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 39(2): 233–244 [张武肖, 孙盛明, 戈贤平, 等. 急性氨氮胁迫及毒后恢复对团头鲂幼鱼鳃、肝和肾组织结构的影响. *水产学报*, 2015, 39(2): 233–244]

(编辑 冯小花)

## Acute Toxicity of Ammonia Nitrogen to *Scylla paramamosain* and Its Influence on Immune Factors in Serum

PENG Junhui<sup>1,2</sup>, CHEN Liying<sup>3</sup>, CHENG Changhong<sup>1</sup>, FENG Juan<sup>1</sup>, MA Hongling<sup>1</sup>, GUO Zhixun<sup>1</sup><sup>①</sup>

(1. Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 210306; 3. College of Life Science, Guangzhou University, Guangzhou 510006)

**Abstract** Using the toxicity method, we studied the acute toxicity of ammonia nitrogen to *Scylla paramamosain* and its influence on phenol oxidase (PO), alkaline phosphatase (AKP), acid phosphatase (ACP), superoxide dismutase (SOD), and lysozyme (LZM) in the conditions of different ammonia nitrogen concentrations of 0 (C0, control group), 10 (C10), 20 (C20), 30 (C30), 40 (C40), 50 mg/L (C50) and different times of 0, 6, 24, 48, and 72 h. The results showed that the semi-lethal concentration (LC<sub>50</sub>) at 24 and 48 h of ammonia-N were 104.793 and 66.124 mg/L respectively, and the safe concentration (SC) was 7.90 mg/L. The LC<sub>50</sub> at 24 and 48 h of NH<sub>3</sub>-N were 8.396 and 5.298 mg/L respectively, and the SC was 0.63 mg/L. The LZM activity of each treatment group was significantly lower than that of C0 group ( $P < 0.01$ ) at 6, 24, 48, and 72 h. AKP and ACP activity of C10, C20, and C40 groups was significantly higher than that of control group at 24 h ( $P < 0.05$ ), while the SOD activity of the C20 group was significantly lower than that of other stress times ( $P < 0.05$ ). At 72 h, the PO activity of C30, C40, and C50 groups were significantly higher than that of C0 group ( $P < 0.05$ ). Under the experimental conditions, ammonia nitrogen that was lower than 40 mg/L could significantly enhance the AKP and ACP activity of *S. paramamosain* over a 24 h period, while 50 mg/L ammonia nitrogen had inhibitory effects. Ammonia nitrogen in all groups had significant inhibitory effects on LZM activity of *S. paramamosain*, which had no significant effect on SOD activity, but had an obvious enhancement effect on activity of PO by 72 h.

**Key words** *Scylla paramamosain*; Ammonia nitrogen; Safe concentration; Immune-related enzyme

① Corresponding author: GUO Zhixun, E-mail: guozhixun1@163.com