

亚硝酸氮对中华小长臂虾的急性毒性及非特异性免疫指标的影响

包杰¹ 姜宏波¹ 程慧¹ 余秋新¹ 于业辉¹ 李晓东^{1,2*}

(¹沈阳农业大学畜牧兽医学院, 沈阳 110866; ²盘锦光合蟹业有限公司, 辽宁盘锦 124220)

摘要 采用生物毒性实验方法研究了亚硝酸氮(NO_2^- -N)对体重为(0.28 ± 0.05) g 的中华小长臂虾(*Palaemonetes sinensis*)的急性毒性作用。结果表明:在温度为 18 ± 1 °C、pH 7.3 ± 0.1 条件下, NO_2^- -N 对中华小长臂虾 24、48、72 和 96 h 的半致死浓度(LC_{50})分别为 37.9、27.3、24.9 和 23.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,安全浓度为 2.32 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;根据 96 h LC_{50} 和安全浓度按照等差数列设置 5 个 NO_2^- -N 浓度梯度,分别为 6.0、9.5、13.0、16.5 和 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,研究了 NO_2^- -N 胁迫对中华小长臂虾非特异性免疫指标的影响;在 24 h 时,除 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组肌肉的超氧化物歧化酶(SOD)活性外,各 NO_2^- -N 处理组的中华小长臂虾肝胰腺和肌肉 SOD 活性与对照组均无显著性差异($P > 0.05$);到 96 h 时,13、16.5 和 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组肝胰腺 SOD 活性下降,显著低于对照组($P < 0.05$),但肌肉组织则未出现显著性下降,而 6 和 9.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组显著性高于对照组;24 h 时,只有最高浓度 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组的肝胰腺酸性磷酸酶(ACP)活性以及 6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组的碱性磷酸酶(AKP)活性显著高于对照组,其他处理组与对照组均无显著性差异;随着处理时间的延长,到达 96 h 时,出现了与 SOD 相同的趋势,即 13、16.5 和 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组酶活性显著低于对照组($P < 0.05$);与肝胰腺不同的是,24 h 时肌肉组织 ACP 和 AKP 活性出现了明显的“毒物兴奋效应”,除了 13 和 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AKP 外,其他处理组均出现了显著性升高($P < 0.05$);到 96 h 时,除 9.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组外,其他处理组的 ACP 和 AKP 活性均与对照组无显著性差异($P > 0.05$)。本研究发现,中华小长臂虾可耐受较高浓度 NO_2^- -N,而长时间的 NO_2^- -N 胁迫则对中华小长臂虾的免疫酶活性存在抑制作用,研究结果可为中华小长臂虾健康养殖提供科学依据。

关键词 中华小长臂虾;亚硝酸氮;急性毒性;SOD;ACP;AKP

Effect of nitrite-N on acute toxicity and non-specific immune parameters of *Palaemonetes sinensis*. BAO Jie¹, JIANG Hong-bo¹, CHENG Hui¹, SHE Qiu-xin¹, YU Ye-hui¹, LI Xiaodong^{1,2,*} (¹College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; ²Panjin Guanghe Crab Co., Ltd., Panjin 124200, Liaoning, China).

Abstract: An acute biological toxicity test of nitrite-N (NO_2^- -N) on *Palaemonetes sinensis* (with body weight of 0.28 ± 0.05 g) was carried out in the laboratory at 18 ± 1 °C and pH 7.3 ± 0.1 . The results showed that the median lethal concentrations of NO_2^- -N for 24, 48, 72 and 96 h to *P. sinensis* were 37.9, 27.3, 24.9, and 23.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively, and the safety concentration (SC) for 96 h was 2.32 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Then the *P. sinensis* were exposed to five NO_2^- -N concentrations (6, 9.5, 13, 16.5 and 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) and related non-specific immunity indicators were measured at 24, 48 and 96 h. After exposure to NO_2^- -N for 24 h, no significant difference for superoxide dismutase (SOD) activities in the hepatopancreas and muscles was observed among the different treatments ($P > 0.05$), with the exception of the 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ treatment in muscle. At 96 h, the SOD activities in hepatopancreas of the 13, 16.5 and 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ groups were significantly

辽宁省教育厅科学研究一般项目(L2015472)、辽宁省博士科研启动基金项目(201601103)和辽宁省自然基金项目(201602654)资助。

收稿日期: 2017-01-16 接受日期: 2017-06-02

* 通讯作者 E-mail: lxd001@ceraap.com

lower than that in the control group ($P < 0.05$). In comparison, muscle tissues in the 6 and 9.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ groups were significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). At 24 h, there was no significant difference for either acid phosphatase (ACP) or alkaline phosphatase (AKP) activity in hepatopancreas, except that the ACP activity of the 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ group and the AKP activity in the 6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ group were significantly increased. At 96 h, the ACP and AKP activities in the hepatopancreas for the 13, 16.5 and 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ groups were significantly decreased. In comparison, after exposure to NO_2^- -N for 24 h, the ACP and AKP activities in the muscles showed a “poison-intoxication” effect, and they all increased significantly except the AKP activities in the 13 and 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ groups ($P < 0.05$); at 96 h, there was no significant difference among the various treatments ($P > 0.05$) except the 9.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ group. It was concluded that *P. sinensis* could tolerate NO_2^- -N of relatively high concentrations, but exposure to NO_2^- -N for long durations had significant effects on the activities of non-specific immune-related enzymes in *P. sinensis*. Our results provide a better understanding on the healthy aquaculture of *P. sinensis*.

Key words: *Palaemonetes sinensis*; nitrite-N; acute toxicity; SOD; ACP; AKP.

中华小长臂虾(*Palaemonetes sinensis*)是中国唯一有记载的小长臂虾属物种,在分类地位上隶属于十足目,长臂虾科(李新正等,2003)。从外形上看,其体色呈青绿色且透明,腹部有棕黄色的条状斑纹,故又名花腰虾。中华小长臂虾在中国的分布主要以北方为主,后期由于各地区渔业运输使得其在南方也成为常见的淡水虾(李新正等,2003)。作为一种水域环境中具有重要生态价值的甲壳动物,其不仅具有观赏价值,而且味道鲜美,营养价值高,更是出口日韩市场的经济品种,因此开展中华小长臂虾的人工养殖前景广阔。但是,目前关于中华小长臂虾的基础研究非常有限,仅在资源调查和虾的分类以及温度耐受性时有所提及(张静等,2009;姜宏波等,2016),尚缺乏详细的基础生态学研究,这也限制了中华小长臂虾人工养殖的开展。

水产养殖技术的提升使得水生动物的养殖密度逐渐增大,配合饲料的投入量也会增多,造成了水体中积累了大量的残饵和粪便,这些残饵和粪便的分解会产生大量的氨,在缺氧条件下使得硝化作用受阻,引起亚硝酸氮(NO_2^- -N)含量升高(Kroupova et al., 2005;高明辉等,2008),成为了高密度水产动物养殖环境的重要污染成分。研究发现, NO_2^- -N含量过高会对水产动物的生理指标和组织器官造成严重影响(Espino et al., 2015; Freitag et al., 2015),进而影响其生长和发育,甚至引起死亡。因此,了解养殖生物对 NO_2^- -N的耐受性对开展人工养殖具有重要意义。本实验以中华小长臂虾为对象,首先通过96 h的 NO_2^- -N毒性实验获得中华小长臂虾的安全浓度,在此基础上研究 NO_2^- -N胁迫对其非特异性免疫酶活性的影响,旨在探讨 NO_2^- -N对中华小长

臂虾的毒害机制,为中华小长臂虾的健康养殖提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验在沈阳农业大学水产养殖室进行,所用中华小长臂虾由盘锦光合蟹业有限公司提供,在实验室内养殖14天,待其适应室内环境后,挑选体色正常,体质健壮,体重为 $0.28 \pm 0.05 \text{ g}$ 的个体进行实验。

1.2 实验方法

1.2.1 NO_2^- -N 急性毒性实验 实验设有对照组和实验组,以不添加 NO_2^- -N的自来水为对照组,根据预试验结果,按照等比数列设置实验组浓度梯度,分别为16.2、19.5、23.4、28.0、33.6、40.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, NO_2^- -N浓度用亚硝酸钠(分析纯)配制,每24 h换实验液一次。每个实验梯度均设置3个平行组,每个平行组有10尾中华小长臂虾,实验水体为2 L,水温 $18 \pm 1.0 \text{ }^\circ\text{C}$,pH 7.3 ± 0.1 。实验期间不充气,定时观察个体死亡情况,及时取出死亡个体,准确记录24、48、72和96 h的死亡尾数。实验结束后计算 NO_2^- -N对中华小长臂虾的半致死浓度(LC_{50}),并按公式计算出安全浓度(SC)。

1.2.2 NO_2^- -N 对中华小长臂虾非特异性免疫指标的影响 通过急性毒性实验获得中华小长臂虾的96 h半致死浓度为23.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,安全浓度为2.32 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,在此区间按照等差数列设置5个浓度梯度,分别6.0、9.5、13.0、16.5和20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,以不添加 NO_2^- -N的自来水为对照组。实验组 NO_2^- -N浓度用亚硝酸钠(NaNO_2 ,分析纯)来配置。每组3个

平行组,每个平行放 20 尾虾,实验在 30 L 的玻璃缸中进行,水体为 15 L。实验期间不投饵,并及时清污,每 24 h 换实验液一次。在实验开始后 24、48 和 96 h 取肝胰腺和肌肉用于超氧化物歧化酶(SOD)、酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(AKP)活性测定取样。免疫酶的测定方法如下:样品蛋白浓度、SOD、ACP、AKP 活性均使用南京建成试剂盒进行测定,具体测定参照试剂盒说明书进行。

肝胰腺和肌肉 SOD 酶活性单位定义为每毫克蛋白在 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达到 50%时所对应的 SOD 量为 1 个酶活性单位,以 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$ 表示。

肝胰腺和肌肉 ACP 酶活性单位定义为每克蛋白样品在 37 ℃与基质作用 30 min 产生 1 mg 酚为 1 个活性单位,以金氏单位 $\cdot \text{g}^{-1} \text{ prot}$ 表示。

肝胰腺和肌肉 AKP 酶活性单位定义为每克蛋白样品在 37 ℃与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚为 1 个活性单位,以金氏单位 $\cdot \text{g}^{-1} \text{ prot}$ 表示。

1.3 数据处理

根据前期统计的死亡数量,计算出死亡百分率,将死亡百分率转化为死亡概率单位,建立 24、48、72 和 96 h 的 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 质量浓度的对数(x)与中华小长臂虾死亡概率单位(y)间的直线回归方程,根据方程求算 LC_{50} ;应用 $SC = 0.1 \times 96 \text{ h } LC_{50}$ 求得 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 安全质量浓度估算值(周永欣等,1989)。利用 SPSS 18.0 软件对不同 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 浓度处理下 3 种酶活性进行单因素方差分析(ANOVA)和 Duncan 多重比较,以 $P < 0.05$ 作为差异显著性水平。

2 结果与分析

2.1 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 急性毒性实验

由表 1 可知,对照组在 96 h 内无死亡,实验组则是随 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 浓度越高,对中华小长臂虾的毒性越强,死亡率越高。同一 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 浓度,随着时间的延长,对中华小长臂虾的毒性作用增强。根据表 1 数据求出 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 对中华小长臂虾的 24、48、72、96 h 的半致死浓度分别为 37.9、27.3、24.9、23.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,安全浓度为 2.32 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (表 2)。

2.2 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 对中华小长臂虾 SOD 活性的影响

从图 1 可以看出,在 24 h 时,各 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 处理组与对照组间无显著性差异($P > 0.05$);在 48 h 时,各 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 处理组所表现出的变化趋势与 24 h 时一致,各处理组间无显著差异($P > 0.05$);但到 96 h 时,

表 1 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 对中华小长臂虾对虾急性毒性实验结果
Table 1 Result of acute toxicity test of $\text{NO}_2^- \text{-N}$ on *Palaemonetes sinensis*

亚硝酸氮浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	死亡率(%)			
	24 h	48 h	72 h	96 h
对照组(CK)	0.0	0.0	0.0	0.0
16.2	0.0	6.7	10.0	16.7
19.5	0.0	10.0	10.0	20.0
23.4	16.7	33.3	43.3	50.0
28.0	36.7	50.0	66.7	73.3
33.6	43.3	70.0	100.0	100.0
40.1	50.0	90.0	100.0	100.0

表 2 中华小长臂虾不同时间的半致死浓度
Table 2 Half lethal concentration of $\text{NO}_2^- \text{-N}$ for *Palaemonetes sinensis* in different time

处理时间 (h)	回归方程	相关系数	样本数	$\text{NO}_2^- \text{-N}$ LC_{50} ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
24	$y = 3.7537x + 7.7106$	0.8777	30	37.9
48	$y = 7.0651x + 11.116$	0.9838	30	27.3
72	$y = 7.9094x + 12.162$	0.8986	30	24.9
96h	$y = 6.9744x + 11.527$	0.9334	30	23.2

除 6 和 9.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组与对照组无显著性差异外,13、16.5 和 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 各处理组的酶活性均开始下降,并显著低于对照组($P < 0.05$)。

如图 2 所示,在 24 h 时,除了最高浓度 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组开始显著性升高外,其他处理组与对照组之间均无显著性差异($P > 0.05$)。在 48 h 时,6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组开始显著性升高,其他处理组开始降低,并在 13 和 16.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组显著低于对照组($P < 0.05$)。至 96 h,6 和 9.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组显著性高于对照组,其他浓度组酶活性有所回升,但与对照组

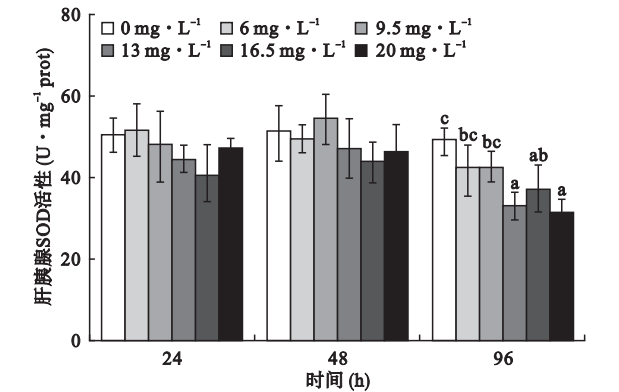


图 1 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 对中华小长臂虾肝胰腺 SOD 活性的影响
Fig.1 Effect of $\text{NO}_2^- \text{-N}$ concentrations on SOD activity in the hepatopancreas of *Palaemonetes sinensis*
图中同一时间组中标有不同字母的数据表示相互间差异显著($P < 0.05$)。

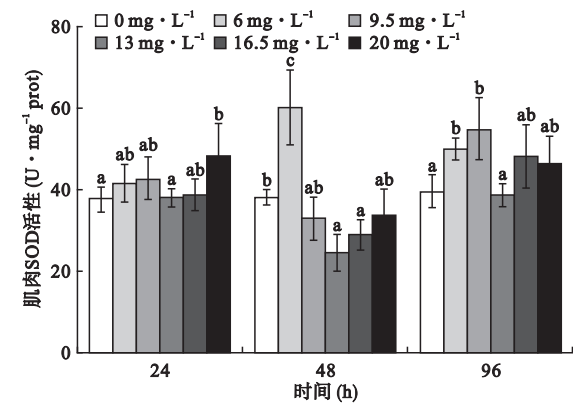


图2 NO₂⁻-N对中华小长臂虾肌肉SOD活性的影响
Fig.2 Effect of nitrite-N concentrations on SOD activity in the muscle of *Palaemonetes sinensis*
图中同一时间组中标有不同字母的数据表示相互间差异显著 ($P < 0.05$)。

之间差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.3 NO₂⁻-N对中华小长臂虾ACP活性的影响

从图3可以看出,在24 h时,除了最高浓度20 mg · L⁻¹组开始显著性升高外,其他处理组与对照组之间均无显著性差异 ($P > 0.05$)。在48 h时,20 mg · L⁻¹的处理组酶活性逐渐回落,各处理组与对照组之间均无显著性差异 ($P > 0.05$)。当达到96 h时,高浓度组下降显著,13和16.5 mg · L⁻¹处理组显著低于对照组 ($P < 0.05$),20 mg · L⁻¹处理组则显著低于所有处理组 ($P < 0.05$)。

中华小长臂虾肌肉中的ACP活性与肝胰腺有所不同(图4),在24 h时,各NO₂⁻-N处理组的ACP活性相比于对照组均出现了显著性增加 ($P < 0.05$)。在48 h时,除9.5 mg · L⁻¹处理组继续升高外,其他处理组均有所下降,13、16.5和20 mg · L⁻¹处理组与

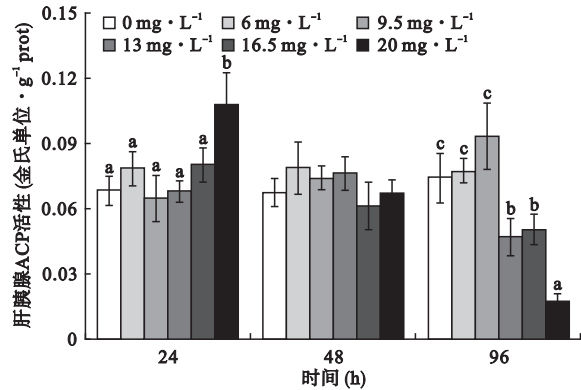


图3 NO₂⁻-N对中华小长臂虾肝胰腺ACP活性的影响
Fig.3 Effect of NO₂⁻-N concentrations on ACP activity in the hepatopancreas of *Palaemonetes sinensis*
图中同一时间组中标有不同字母的数据表示相互间差异显著 ($P < 0.05$)。

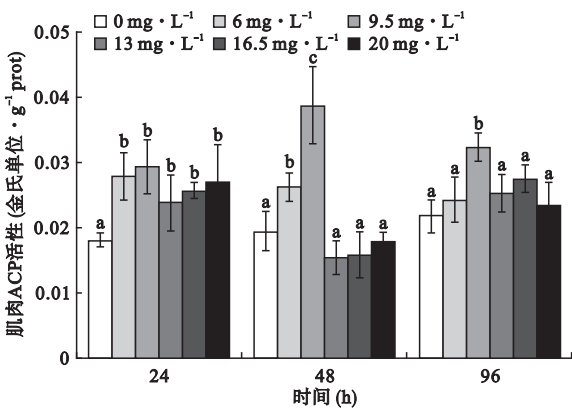


图4 NO₂⁻-N对中华小长臂虾肌肉ACP活性的影响
Fig.4 Effect of NO₂⁻-N concentrations on ACP activity in the muscle of *Palaemonetes sinensis*
图中同一时间组中标有不同字母的数据表示相互间差异显著 ($P < 0.05$)。

对照组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。在96 h时,除9.5 mg · L⁻¹处理组要显著高于对照组 ($P < 0.05$)外,其他处理组与对照组之间均无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.4 NO₂⁻-N对中华小长臂虾AKP活性的影响

从图5可以看出,在24 h时,AKP活性随着处理浓度的增加而下降,在6 mg · L⁻¹时最高,显著高于对照组,在20 mg · L⁻¹时最低,显著低于对照组 ($P < 0.05$)。在48 h时,16.5 mg · L⁻¹处理组的AKP活性与对照组也出现了显著性差异,其余与24 h时趋势相同。在96 h时,各处理组的AKP活性均有所下降,6和9.5 mg · L⁻¹处理组与对照组无显著性差异,而13、16.5和20 mg · L⁻¹处理组则都显著低于对照组 ($P < 0.05$)。

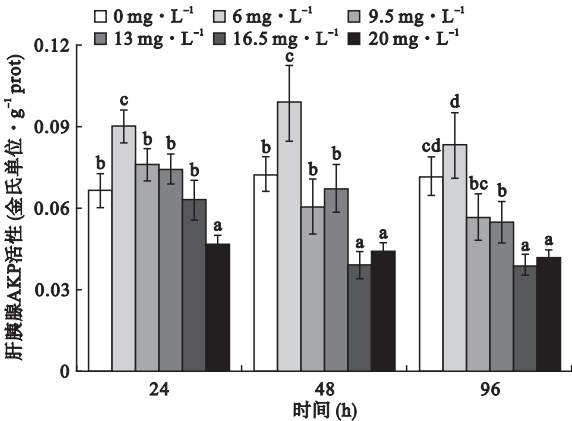


图5 NO₂⁻-N对中华小长臂虾肝胰腺AKP活性的影响
Fig.5 Effect of NO₂⁻-N concentrations on AKP activity in the hepatopancreas of *Palaemonetes sinensis*
图中同一时间组中标有不同字母的数据表示相互间差异显著 ($P < 0.05$)。

表 3 NO₂⁻-N 对几种虾类的 96 h LC₅₀
Table 3 96 h LC₅₀ of NO₂⁻-N to several shrimps

物种	规格 (cm)	实验条件	96 h LC ₅₀ (mg · L ⁻¹)	参考文献
凡纳滨对虾 <i>Penaeus vannamei</i>	0.99±0.10	28.3±2.6 ℃	19.1	彭自然等,2004
	10	S=31,29±1 ℃	89.0	黄翔鸽等,2006
	10	S=17,29±1 ℃	39.5	黄翔鸽等,2006
克氏原螯虾 <i>Procambarus clarkia</i>	1.1~1.5	20±1 ℃	69.74	於叶兵等,2011
	6.91±0.41	20.9±2.9 ℃	35.70	钟君伟等,2014
中国明对虾 <i>Penaeus chinensis</i>	1.9~2.1	21 ℃	43.8	王娟等,2007
斑节对虾 <i>Penaeus monodon</i>	2.84±0.62	S=15,25 ℃	1449	Tsai <i>et al.</i> , 2002
		S=25,25 ℃	1575	Tsai <i>et al.</i> , 2002
		S=35,25 ℃	2316	Tsai <i>et al.</i> , 2002
罗氏沼虾 <i>Macrobrachium rosenbergii</i>	3	23 ℃	43.87	王龙等,2011
南美白对虾 <i>Penaeus vannamei</i>	5	27 ℃	26.67	孙国铭等,2002

在 24 h 时,中华小长臂虾肌肉中 AKP 活性与肝胰腺表现出了不同的趋势,各 NO₂⁻-N 处理组的 AKP 活性相比于对照组均有所升高,并在 6、9.5、16.5 mg · L⁻¹ 时出现了显著性差异 ($P<0.05$)。在 48 h 时 6 和 9.5 mg · L⁻¹ 酶活性继续升高,仍显著高于对照组 ($P<0.05$)。相比之下,16.5 和 20 mg · L⁻¹ 处理组则开始迅速降低,要显著低于对照组 ($P<0.05$)。在 96 h 时,除 9.5 mg · L⁻¹ 外,其余处理组与对照组之间都无显著性差异 ($P>0.05$) (图 6)。

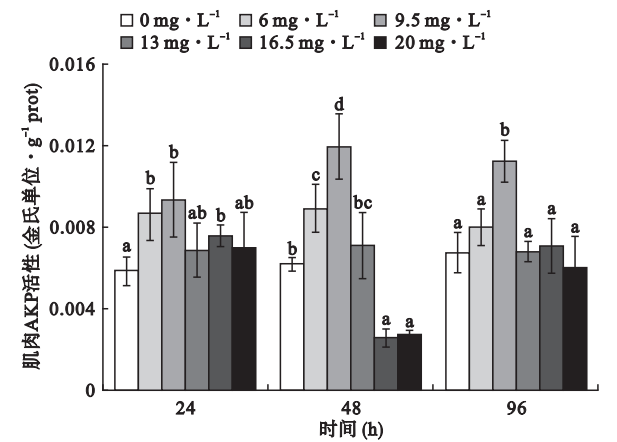


图 6 NO₂⁻-N 对中华小长臂虾肌肉 AKP 活性的影响
Fig.6 Effect of NO₂⁻-N concentrations on AKP activity in the muscle of *Palaemonetes sinensis*
图中同一时间组中标有不同字母的数据表示相互间差异显著 ($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 亚硝酸盐对中华小长臂虾的毒性

亚硝酸氮是硝化作用和脱氮作用的中间产物,若硝化作用或者脱氮作用过程中的任何一个环节的

不平衡均能导致亚硝酸盐含量的增加 (Hargreaves, 1998),在高密度水产养殖水体中,大量残饵和粪便的分解是亚硝酸盐含量不断升高的主因。在本实验条件下,中华小长臂虾的 96 h LC₅₀ 为 23.2 mg · L⁻¹,比克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*)、斑节对虾 (*Penaeus monodon*)、中国明对虾 (*Penaeus chinensis*) 以及罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 的 96 h LC₅₀ 低 (表 3),可以看出,中华小长臂虾对亚硝酸盐的耐受性低,但由于物种间亚硝酸盐的毒性与很多因素相关,如溶氧、规格、盐度等 (彭自然等,2004; 黄翔鸽等,2006; 胡贤德等,2009; 王龙等,2011),因此与本实验数据的对比可作为参考。我国渔业水质标准中规定亚硝酸盐浓度小于 0.2 mg · L⁻¹,而在本实验温度 18 ℃ 条件下,中华小长臂虾对亚硝酸盐的安全浓度为 2.32 mg · L⁻¹。由此可见,中华小长臂虾可耐受较高浓度的亚硝酸盐。如遇夏季高温季节,中华小长臂虾对水体中亚硝酸的耐受性还有待进一步研究。

3.2 亚硝酸盐对中华小长臂虾非特异性免疫指标的影响

正常生理状态下,生物机体可产生 SOD 以清除体内细胞代谢产生的超氧阴离子自由基,使其含量始终维持在较低水平,避免超氧阴离子自由基对生物机体的损伤。当生物体受到环境胁迫时,体内的氧自由基含量会增加,机体为了抵御不良环境,会增加 SOD 的合成来清除过多的氧自由基,Stebbing (1982) 认为这可能是生物机体在低浓度毒物条件下的增益效应,叫做“毒物兴奋效应” (poison-intoxication effect)。聂志娟等 (2014) 研究铜对刀鲚 (*Coilia ectenes*) 肝抗氧化酶活性以及蒋琦辰等

(2013)在研究氨氮急性胁迫对红螯光壳螯虾(*Cherax quadricarinatus*)幼虾相关免疫指标的影响时也发现了这种现象。在本实验的24 h时,并未观察到所谓的“毒性兴奋现象”,亚硝酸盐处理组的肝胰腺SOD活性与对照组之间并没有显著性差异,推测可能原因是24 h已经超过了出现“毒性兴奋现象”的时间,洪美玲(2007)在研究亚硝酸盐对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)的毒性作用时发现,10 mg·L⁻¹的亚硝酸盐处理3和6 h时,SOD出现了显著性升高,但到24和48 h则与对照组之间无显著性差异。洪美玲(2007)认为,随着胁迫时间的延长,低浓度的增益效应消失,导致抗氧化酶活性下降与对照组之间差异不显著所致。当处理时间达到96 h时,高浓度组的SOD活性显著低于对照组,可能长期的亚硝酸盐胁迫使中华小长臂虾产生的氧自由基量超过了其自身的清除阈值,导致细胞受到氧化损伤和功能受到抑制进而导致SOD活性的降低,这与其他水产动物的研究结果相一致(黄翔鹄等,2006;韩英等,2007)。

甲壳动物与高等动物不同,其体内无法产生免疫球蛋白,缺乏获得性免疫,只能依靠体内的非特异性免疫来识别和清除进入到体内的异物,保证机体的安全(刘雪兰等,2003)。磷酸酶广泛存在于动植物体内,又叫做正磷酸单酯水解酶,是一种能够催化含磷化合物水解的酶类(Bull *et al.*, 2002)。依据发生催化时的最适宜pH,可以将磷酸酶划分为ACP和AKP(詹付凤等,2007)。作为溶酶体的重要组成部分,ACP和AKP对甲壳动物的非特异性免疫起着重要作用。一般来讲,ACP和AKP在受到外界环境胁迫时,也会出现与SOD类似的变化趋势,即短时间内可能出现“毒性兴奋现象”,随着时间的延长,其活性开始显著性下降(钟君伟等,2014)。在本研究中,肝胰腺的AKP与ACP的活性变化趋势相似,在个别浓度组有短暂的酶活性升高,出现了毒性兴奋效应,但是随着浓度的增加,有明显的降低趋势;尤其在低浓度组,长时间的亚硝酸盐胁迫会显著抑制中华小长臂虾肝胰腺的ACP和AKP活力,出现免疫疲劳,降低中华小长臂虾机体的免疫防御能力,对中华小长臂虾的养殖是不利的。与肝胰腺不同的是,肌肉组织中则出现了明显的增益效应,尤其是低浓度组,随着时间的延长,各处理组ACP和AKP酶活力虽开始下降,但仍不低于对照组,甚至在9.5 mg·L⁻¹依然高于对照组,这也说明了动物不同组织

对于亚硝酸盐胁迫表现出的变化趋势存在差异。在本研究中,SOD、ACP和AKP三种酶的活性大小均为肝胰腺>肌肉,这可能与这几种酶的基因在各个组织中的表达量不同有关,田娟等(2011)在研究AKP在大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)不同组织的表达时发现,AKP在肝胰腺的表达量要远远高于肌肉,这说明相比于肌肉组织,中华小长臂虾3种酶在肝胰腺中发挥的作用更大,这与区又君等(2011)在卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)中的研究相一致。

参考文献

- 高明辉,马立保,葛立安,等. 2008. 亚硝酸盐在水生动物体内的吸收机制及蓄积的影响因素. 南方水产, **4**(4): 73-79.
- 韩英,张辉,王琨. 2007. 亚硝态氮对鲤鱼种血液SOD及GSH-Px的影响. 淡水渔业, **37**(1): 66-68.
- 洪美玲. 2007. 水中亚硝酸盐和氨氮对中华绒螯蟹幼体的毒性效应及维生素E的营养调节(博士学位论文). 上海:华东师范大学.
- 胡贤德,孙成波,王平,等. 2009. 不同盐度条件下亚硝酸盐氮对斑节对虾的毒性影响. 沈阳农业大学学报, **40**(1): 103-106.
- 黄翔鹄,李长玲,郑莲,等. 2006. 亚硝酸盐氮对凡纳滨对虾毒性和抗病相关因子影响. 水生生物学报, **30**(4): 466-471.
- 姜宏波,包杰,丛岩懿,等. 2016. 中华小长臂虾对温度的耐受性及温度对其呼吸代谢的影响. 生态学杂志, **35**(8), 2202-2207.
- 蒋琦辰,顾曙余,张文逸,等. 2013. 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. 水产学报, **37**(7): 1066-1072.
- 李新正,刘瑞玉,梁象秋. 2003. 中国长臂虾总科的动物地理学特点. 生物多样性, **11**(5): 393-406.
- 刘雪兰,余为一. 2003. 甲壳动物免疫因子的研究进展. 水生生物学报, **27**(4): 418-421.
- 聂志娟,徐钢春,张守领,等. 2014. 铜对刀鲚幼鱼的急性毒性及对肝抗氧化酶活性与组织结构的影响. 中国水产科学, **21**(1): 161-168.
- 彭自然,臧维玲,高杨,等. 2004. 氨和亚硝酸盐对凡纳滨对虾幼虾的毒性影响. 上海海洋大学学报, **13**(3): 274-278.
- 区又君,罗奇,李加儿. 2011. 卵形鲳鲹碱性磷酸酶和酸性磷酸酶的分布及其低温保存. 南方水产科学, **7**(2): 49-54.
- 孙国铭,汤建华,仲霞铭. 2002. 氨氮和亚硝酸盐对南美白对虾的毒性研究. 水产养殖, (1): 22-24.
- 田娟,施志仪. 2011. 碱性磷酸酶在大菱鲆不同组织的表达及其与甲状腺激素的关系. 中国水产科学, **18**(1): 208-213.
- 王娟,曲克明,刘海英,等. 2007. 不同溶氧条件下亚硝酸盐和氨氮对中国对虾的急性毒性效应. 渔业科学进展,

- 28(6): 1–6.**
- 王 龙, 郝志敏, 王 晶. 2011. 两种溶氧条件下亚硝酸盐和氨氮对罗氏沼虾毒性比较的研究. 水产营养与饲料科技, **25(8): 12–16.**
- 於叶兵, 陆 伟, 黄金田, 等. 2011. 亚硝酸盐和硫化物对克氏原螯虾幼虾的毒性效应研究. 水生态学杂志, **32(1): 111–114.**
- 詹付凤, 赵欣平. 2007. 重金属镉对鲫鱼碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活性的影响. 四川动物, **26(3): 641–643.**
- 张 静, 于洪贤. 2009. 松花江哈尔滨段春季底栖动物群落结构研究及水质评价. 水产学杂志, **22(2): 40–45.**
- 钟君伟, 朱永安, 付佩胜, 等. 2014. 亚硝酸盐氮对克氏原螯虾成虾的毒性及其抗病因子的影响. 长江大学学报: 自然科学版, **11(2): 36–40.**
- 周永欣, 张宗涉. 1989. 水生生物毒性试验方法. 北京: 农业出版社.
- Bull H, Murray PG, Thomas D, *et al.* 2002. Acid phosphatases. *Molecular Pathology*, **55: 65–72.**
- Espino ML, Díaz AC, Velurtas SM. 2015. Effects of exposure to nitrite on the antioxidant enzymes activity and the histopathological response of prawn *Palaemonetes argentine*. *Hidrobiológica*, **25: 24–30.**
- Freitag AR, Thayer LAR, Leonetti C, *et al.* 2015. Effects of elevated nitrate on endocrine function in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, **436: 8–12.**
- Hargreaves JA. 1998. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. *Aquaculture*, **166: 181–212.**
- Kroupova H, Machova J, Svobodova Z. 2005. Nitrite influence on fish: A review. *Veterinarni Medicina-Praha*, **50: 461–471.**
- Stebbing ARD. 1982. Hormesis: The stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Science of the Total Environment*, **22: 213–234.**
- Tsai SJ, Chen JC. 2002. Acute toxicity of nitrate on *Penaeus monodon*, juveniles at different salinity levels. *Aquaculture*, **213: 163–170.**
-
- 作者简介** 包 杰, 女, 1980 年生, 博士研究生, 研究方向为甲壳动物遗传育种。E-mail: yh_baojie@163.com
- 责任编辑** 李凤芹
-