

亚硝态氮和氨态氮急性胁迫下曼氏无针乌贼幼体血液的生化指标

尹飞¹, 孙鹏¹, 彭士明¹, 范帆^{1,2}, 施兆鸿^{1,2,*}

1. 中国水产科学研究院东海水产研究所 农业部海洋与河口 渔业重点开放实验室, 上海 200090
2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 将曼氏无针乌贼幼体置于 24 h 半致死剂量的亚硝态氮和氨态氮溶液中 (10 mg L⁻¹ NaNO₂ 和 300 mg L⁻¹ NH₄Cl), 检测 6、12 和 24 h 各点及对照组曼氏无针乌贼幼体血液生化指标的变化。结果表明, 随着处理时间的延长, NaNO₂ 处理组血细胞密度 (THC) (P < 0.05)、甘油三酯 (TG) (P < 0.05) 和谷丙转氨酶 (GPT) (P < 0.05) 均呈“先降后升”的变化趋势, 这与谷草转氨酶 (GOT) (P < 0.05) 和 GOT/GPT 比率 (P < 0.05) 的变化趋势相反; 血糖 (GLU) 呈“升降升” (P > 0.05) 的趋势; 总胆固醇 (CH) 呈“逐步下降” (P > 0.05) 的趋势, 这与总蛋白 (TMP) (P < 0.05) 的变化趋势相反。NH₄Cl 处理组 THC (P < 0.05)、GPT (P < 0.05) 和 GOT (P < 0.05) 均呈“逐步降低”的变化趋势, 这与 GOT/GPT 比率 (P < 0.05) 的变化趋势相反; GLU 呈“降升降” (P < 0.05) 的变化趋势, 这与 CH (P < 0.05)、TG (P < 0.05) 和 TMP (P < 0.05) 的趋势相反。据此推测, 亚硝态氮和氨态氮胁迫下, 血液生化指标变化趋势的差异可能与这两种毒物自身的作用特点有关。肝脏受到亚硝态氮的毒害要大于氨态氮, 但这也并非机体死亡的主要原因。蛋白与血糖在消除氨态氮时发挥着互相补充的作用, 且与总胆固醇和甘油三酯一样可以作为氨态氮胁迫的指示物。

关键词: 曼氏无针乌贼; 幼体; 亚硝态氮; 氨态氮; 生化指标

文章编号: 1673-5897(2011)6-289-07 中图分类号: Q178.4; X503.225 文献标识码: A

Biochemical Parameters in Juvenile *Sepiella maindroni* Induced by Acute Exposure to Nitrite-N or Ammonia-N

Yin Fei, Sun Peng, Peng Shiming, Fan Fan², Shi Zhaohong^{2,*}

1. Key and Open Laboratory of Marine and Estuarine Fisheries Ministry of Agriculture East China Sea Fisheries Research Institute Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China

Received 24 October 2010 accepted 29 April 2011

Abstract: To better understand the effects of nitrite-N and ammonia-N on blood of the juvenile *Sepiella maindroni*, juvenile *Sepiella maindroni* were exposed to 10 mg L⁻¹ sodium nitrite or 300 mg L⁻¹ ammonium chloride for 0, 6, 12 and 24 hours respectively. The blood immune parameters, total haemocyte count (THC), glucose (GLU), cholesterol (CH), triglyceride (TG), total protein (TMP) concentrations, glutamic pyruvic transaminase (GPT) and glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) activities, GOT/GPT ratios were investigated in this study. The results show that THC (P < 0.05), TG concentration (P < 0.05) and GPT activity (P < 0.05) first fell then rose, running counter to that of GOT ac-

收稿日期: 2010-10-24 录用日期: 2011-04-29

基金项目: 上海市国际科技合作基金项目 (10410703600) 和中央级公益性科研院所基本科研业务费 (东 2009M08 东 2008M14 东 2009M05)

作者简介: 尹飞 (1980-) 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 鱼类生理生态学研究, Email: feig895@yahoo.com.cn * 通讯作者 (Corresponding author), Email: shizhi@shouai.com

tivity ($P < 0.05$) and GOT/GPT ratio ($P < 0.05$); GLU concentration ($P > 0.05$) first rose then fell and rose again at 24 h. CH concentration ($P > 0.05$) decreased significantly running counter to that of TMP ($P < 0.05$) with the elapse of nitrite-N exposure time. With the elapse of ammonia-N exposure time, THC ($P < 0.05$), GPT ($P < 0.05$) and GOT activities ($P < 0.05$) decreased significantly running counter to that of GOT/GPT ratio ($P < 0.05$), GLU concentration ($P < 0.05$) first fell then rose and fell again at 24 h running counter to that of CH ($P < 0.05$), TG ($P < 0.05$) and TMP ($P < 0.05$). The results suggest that the differences of blood biochemical parameters between nitrite-N and ammonia-N result from their characteristics. Liver was more seriously damaged caused by nitrite-N than ammonia-N, however that was not the main reason for death. Protein and GLU were complementary in eliminating ammonia-N and which can be used as biomarkers of exposure to ammonia-N with CH and TG.

Keywords: *Septelhamandron*; juvenile nitrite-N; ammonia-N; biochemical parameters

在水产养殖中, 水体中的亚硝态氮和氨态氮是影响水产动物生理活动的重要环境因子。其中, 氨氮主要由生物排泄物、分泌物以及动植物尸体等含氮有机物分解产生, 在水体中可以相互转换的离子氨 (NH_4^+) 和非离子氨 (NH_3) 两种形态存在。其中非离子氨不带电荷, 具有较强的脂溶性, 能够穿透细胞膜, 破坏水生动物的鳃组织并渗入血液, 降低其呼吸机能和血液载氧能力, 最终导致水生动物组织缺氧或中毒死亡^[1]。亚硝酸盐是强氧化剂, 进入动物血液后会导致血淋巴 pH 值下降, 扰乱氮排泄, 使各组织缺氧^[2]。目前, 国内外学者在氨氮对软体动物的影响方面做了大量研究工作, 其中包括: 对黑唇鲍 (*Haliotis rubra*) 的生长^[3]、西施舌 (*Coelmacra antiquate*) 幼贝^[4] 和管角螺 (*Hamifusus tuba*) 稚贝的存活^[5]、文蛤 (*Meretrix meretrix*) 的存活及能量收支^[6]、菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*)^[11] 和栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*)^[7] 的免疫生理生化等方面的研究。

目前, 亚硝态氮和氨态氮胁迫下头足类动物免疫特性的研究少有报道。国内仅见亚硝酸氮对曼氏无针乌贼 (*Septelhamandron*) 幼体的急性毒性及整个个体组织中免疫相关酶类的研究^[8]。由于头足类动物没有免疫球蛋白和淋巴系细胞, 缺乏特异性免疫机制, 因此血液在防御外源物侵害方面起着至关重要的作用^[9], 其中血细胞及其生物大分子是行使各项生理功能的基本要素^[10]。另外, 在不同环境因子的作用下, 血液生理生化指标的变化可以反应出机体受环境胁迫的程度^[11-12]。对环境胁迫下血液生理生化指标进行研究, 可以为揭示机体免疫系统功能提供参考。据此, 本文以曼氏无针乌贼为材料, 通过研究亚硝态氮和氨态氮对其血液生理生化指标的影响, 摸清水体毒物对乌贼造成的胁迫, 从而为头足类养殖过程中水质的检测、环境的优化和疾病的防

控提供依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验材料

曼氏无针乌贼幼体购自福建省宁德市水产科技有限公司, 为人工养殖苗种。运至东海水产研究所海南省琼海市实验中心后, 暂养于室内玻璃钢水槽中 $3 \text{ m} \times 4 \text{ m} \times 1 \text{ m}$, 每日分别于 7:00、12:00、14:00 和 18:00 投喂规格为 4—5 cm 的冰冻南美白对虾 (*Penaeus vannamei*)。暂养盐度为 23.0, 水温 27 ± 1 °C, pH 值 7.5 ± 1 , 溶解氧 $6.0 - 6.5 \text{ mg L}^{-1}$ 。暂养 50 d 后, 随机选取规格为 37 ± 4 g 健康活泼的个体用于正式实验。

正式实验前, 先预设梯度跨度范围较宽的不同亚硝态氮或不同氨态氮浓度的溶液进行预实验。再根据 24 h 时乌贼的死亡情况, 推算出的亚硝态氮或氨态氮对实验乌贼的 24 h- LC_{50} 浓度 (10 mg L^{-1} NaNO_2 和 300 mg L^{-1} NH_4Cl) 经过重复 2 次验证后进行正式实验。亚硝态氮和氨态氮质量浓度分别通过 10 g L^{-1} NaNO_2 和 100 g L^{-1} NH_4Cl 母液进行调节。分析纯 NaNO_2 和 NH_4Cl 购自上海生物工程公司。亚硝态氮和氨态氮实验组各设 3 个平行, 每平行放养 10 只乌贼。实验容器为 $60 \text{ cm} \times 60 \text{ cm} \times 70 \text{ cm}$ 的玻璃缸, 实验中各项理化因子与暂养时相同。实验期间停止投饵。实验开始后每隔 4 h 更换 80% 新鲜配制相同浓度的亚硝态氮和氨态氮实验用水。

1.2 血细胞计数及生化指标测定

于胁迫后第 0 (不添加亚硝酸钠和氯化铵的对照组)、6、12 和 24 小时, 从各实验组随机取出 3 只乌贼个体, 用 2% 乙醇麻醉后, 采用无菌 4.5 号针头和 1 mL 一次性注射器 (江西洪达医疗器械集团有限公司) 从头部血管采血。血细胞密度采用血球计数板在 Olympus CX21 光学显微镜下计数。用于生化

成分(血糖、总胆固醇、甘油三酯、谷丙转氨酶、谷草转氨酶和总蛋白)分析的血液经 TGL-16G型冷冻离心机离心(1776 g, 4°C) 10 min后,采用 CL-8000全自动生化分析仪(日本岛津公司)测试。

1.3 数据分析与统计方法

以一元方差分析(One-way analysis of variance)和 Duncan法进行多重比较。以上统计分析用 SPSS 11.5 软件在 Windows 环境下进行。数据结果为每只乌贼重复 2 次测试的平均值 ± 标准误 (n=6), P<0.05 为差异显著。用 Excel2003 软件作图。

2 结果 (Results)

血细胞密度 (total haemocyte count, THC) 变化见图 1。随着时间的延长, NaNO₂ 和 NH₄Cl 处理组 THC 分别呈“先降后升”(P<0.05)和“逐步下降”(P<0.05)的变化趋势,且 NaNO₂ 和 NH₄Cl 处理组 THC 最高值和最低值分别出现在 24 (NaNO₂)、0 (NH₄Cl) 和 6 (NaNO₂)、24 h (NH₄Cl)。NaNO₂ 和 NH₄Cl 处理组 24 h 时的 THC 均与对照组差异显著 (P<0.05)。

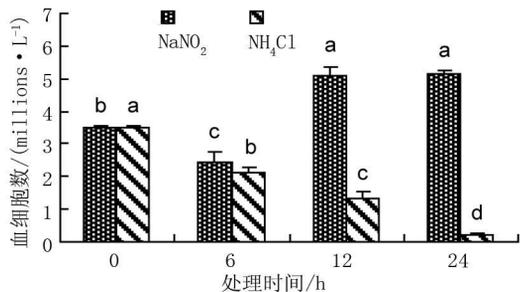


图 1 亚硝态氮和氨态氮急性毒性胁迫下曼氏无针乌贼幼体中血细胞密度变化
(注:图标上方不同字母表示不同时间点之间存在显著性差异 P<0.05 下同)

Fig. 1 THC of *Sepiella maindroni* exposed to nitrite-N and ammoniac-N for 24 h relative to that exposed in control

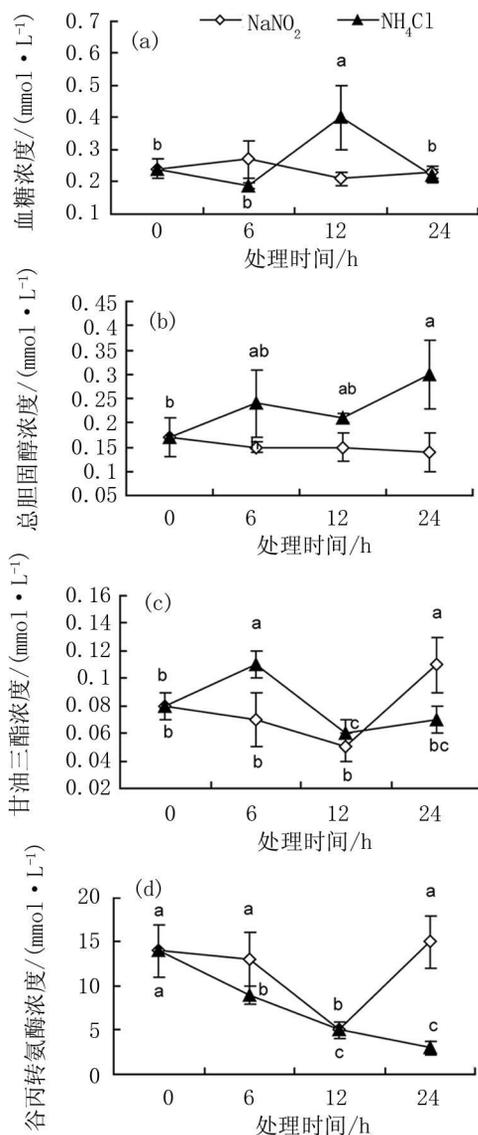
血糖 (GLU) 浓度变化见图 2 (a)。随着时间的延长, NaNO₂ 和 NH₄Cl 处理组 GLU 浓度分别呈“升降升”(P>0.05)和“降升降”(P<0.05)的变化趋势,且二者 GLU 浓度最高点和最低点分别出现在 6、12 和 12、6 h 而二者 24 h 时的 GLU 浓度均与对照组差异不显著 (P>0.05)。

总胆固醇 (CH) 浓度变化见图 2 (b)。随着时间的延长, NaNO₂ 和 NH₄Cl 处理组 CH 浓度分别呈“逐步下降”(P>0.05)和“升降升”(P<0.05)的变化趋

势,且二者 CH 浓度最高点和最低点分别出现在 0、24 和 24、0 h。NH₄Cl 处理组 24 h 时的 CH 浓度与对照组差异显著 (P<0.05)。

甘油三酯 (TG) 浓度变化见图 2 (c)。随着时间的延长, NaNO₂ 和 NH₄Cl 处理组 TG 浓度分别呈“先降后升”(P<0.05)和“升降升”(P<0.05)的变化趋势,且二者 TG 浓度最高点和最低点分别出现在 24、6 和 12、12 h。NaNO₂ 处理组 24 h 时的 TG 浓度与对照组差异显著 (P<0.05)。

谷丙转氨酶 (GPT) 活力变化见图 2 (d)。随着时间的延长, NaNO₂ 和 NH₄Cl 处理组 GPT 活力分别呈“先降后升”(P<0.05)和“逐步降低”(P<0.05)的变化趋势,且二者 GPT 活力最高点和最低点分别出现在 24、0 和 12、24 h。NH₄Cl 处理组 24 h 时的 GPT 活力与对照组呈显著性差异 (P<0.05)。



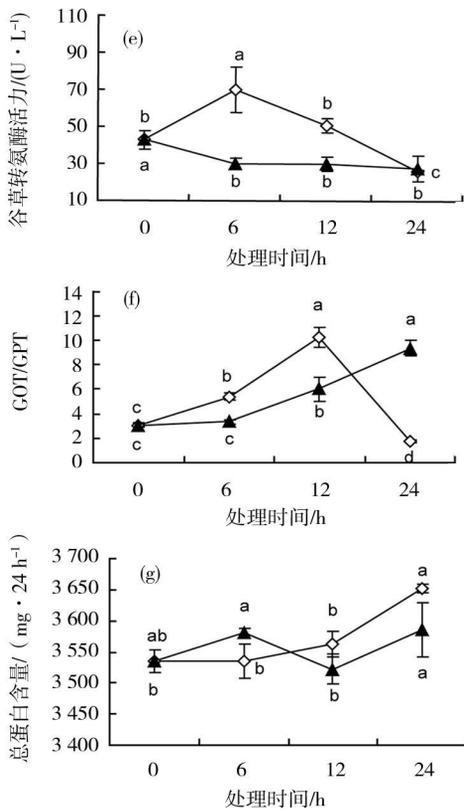


图2 不同亚硝态氮和氨态氮急性毒性胁迫下曼氏无针乌贼幼体中血液生化指标的变化
(a) GLU (b) CH (c) TG (d) GPT (e) GOT
(f) GOT/GPT (g) TMP

Fig. 2 Biochemical parameters in *Sepiella maironii* exposed to nitrite-N and ammonia-N for 24 h

谷草转氨酶(GOT)活力变化见图2(e)。随着时间的延长,NaNO₂和NH₄Cl处理组GOT活力分别呈“先升后降”(P<0.05)和“逐步降低”(P<0.05)的变化趋势,且二者GOT活力最高点和最低点分别出现在6.0和24.24h。NaNO₂和NH₄Cl处理组24h时的GOT活力均与对照组呈显著性差异(P<0.05)。

谷草转氨酶和谷丙转氨酶活力变化的比值(GOT/GPT)见图2(f)。随着时间的延长,NaNO₂和NH₄Cl处理组GOT/GPT分别呈“先升后降”(P<0.05)和“逐步升高”(P<0.05)的变化趋势,且二者GOT/GPT的最高点和最低点分别出现在12.24和24.0h。同时,NaNO₂和NH₄Cl组24h时的GOT/GPT均与对照组呈显著性差异(P<0.05)。

总蛋白(TMP)含量变化见图2(g)。随着时间的延长,NaNO₂和NH₄Cl处理组TMP含量分别呈

“逐步升高”(P<0.05)和“升降升”(P<0.05)的变化趋势,且二者TMP含量最高点和最低点分别出现在24.24和0.12h。NaNO₂处理组24h时的TMP含量与对照组差异显著(P<0.05)。

24h半致死浓度下,在NaNO₂和NH₄Cl中处理24h曼氏无针乌贼幼体血液生化指标的变化情况见图3。NaNO₂和NH₄Cl两种化学试剂处理后同种生化成分的高低顺序为: TG浓度、GLU浓度、GPT活力和TMP均为NaNO₂处理组>NH₄Cl处理组; CH浓度、GOT活力和GOT/GPT比率均为NH₄Cl处理组>NaNO₂处理组。同种试剂处理后不同生化成分间的高低顺序分别为: NaNO₂处理组为GOT>GPT>TMP>GOT/GPT>GLU>CH>TG(P<0.05); NH₄Cl处理组为GOT>GOT/GPT>TMP>GPT>CH>GLU>TG(P<0.05)。

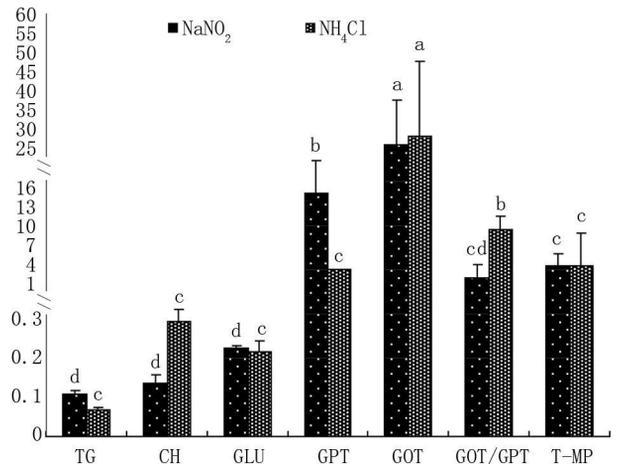


图3 24h半致死浓度下,在亚硝态氮和氨态氮中处理24h曼氏无针乌贼幼体血液生化指标的变化

Fig. 3 Biochemical parameters in *Sepiella maironii* exposed to nitrite-N and ammonia-N at 24 h

3 讨论 (Discussion)

3.1 曼氏无针乌贼幼体半数死亡的亚硝态氮和氨态氮浓度

在水产动物研究中,人们通过分析水体中各种理化因子造成机体半数死亡时的强度或剂量,来判断该物种的耐受性和评价这些致死因子对机体的危害^[3,5,6,13]。由于物种间的差异致使其耐受性也不尽相同,因此研究水体理化因子对动物的半致死强度或剂量将有助于指导水质的监测及致病原因的判断。在不同水产动物中,研究者对亚硝态氮和氨态氮的毒性、半致死浓度和安全浓度均做过较多研

究^[6 14-15]。其中,樊甄姣等研究了亚硝酸氮对 11 日龄的曼氏无针乌贼幼体的影响,结果显示 96 h-LC₅₀ 为 3.71 mg L⁻¹^[8]。而本研究中,亚硝态氮和氨态氮对曼氏无针乌贼幼体 24 h-LC₅₀ 浓度分别是 10 和 300 mg L⁻¹,其中根据《海水水质标准》(GB3097-1997)^[16]的公式计算出 300 mg L⁻¹氯化铵对应的非离子氨浓度为 1.18 mg L⁻¹。上述研究结果让我们初步了解了曼氏无针乌贼对亚硝态氮和氨态氮的耐受性。但在具体研究中,还是要考虑到养殖时动物的生理状况和环境的理化条件^[5]。即使研究对象是同一物种,在一般情况下,发育阶段越高^[17]、营养及生理状况越好^[18],生物体对异常环境的耐受性就越强。而“环境毒物”处理的时间越长、养殖水体的理化因子偏离养殖最佳值越远,机体受到的伤害也就越大^[5]。

3.2 亚硝态氮和氨态氮急性胁迫下曼氏无针乌贼幼体血细胞密度的变化

机体的生长和存活在受到恶化了的环境因子影响时,其血液的生理指标往往也会发生改变^[17]。在免疫防御过程中,血细胞具有在机体的炎症和损伤部位行使吞噬的功能。血细胞的数目和类型也体现着生物体的免疫防御能力。在环境异常和外来物质胁迫下,血细胞数量和活性会发生改变。

本研究中,在亚硝态氮和氨态氮胁迫情况下,乌贼幼体的血细胞密度表现出了不同的变化。其中,氨态氮处理后,乌贼血细胞密度显著降低。该现象在对菲律宾蛤仔^[1]和罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*)^[9]的研究中也得到了证实。而乌贼经过亚硝态氮处理后,血细胞密度在第 6 小时出现短暂下降后,又表现出显著升高的趋势。张亚娟等在对日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 的研究中认为,亚硝酸盐处理后血细胞密度的增加,可能是胁迫浓度和时间不足导致机体一直处于应激状态所致^[2]。Jensen 的研究显示,亚硝酸氮诱导鲤鱼红细胞萎缩是造成红细胞密度增加的原因^[20]。但胡义波等的研究显示,低浓度亚硝态氮处理后的血细胞密度与氨态氮处理后的情况相似,均出现减少^[19]。而本研究中氨态氮和亚硝态氮胁迫下,血细胞密度变化趋势的差异可能与这两种毒物自身的作用特点有关。其中非离子氨为非极性化合物,具有脂溶性强和半径小的特点,极易穿透细胞膜^[1],进而促进血细胞溶解。而水体亚硝酸盐进入血淋巴后,主要通过降低血淋巴的 pH 值致使氧合血红蛋白向脱氧血红蛋白转化,进而降低血淋巴对氧的亲合性^[21],但

对细胞结构的伤害却要小于氨态氮^[19]。据本研究的结果推测,亚硝酸盐引起的应激对血细胞的生成起到了促进作用,这可能预示着机体中亚硝酸氮的含量已经增加到一定程度,需要及时清除。而此时机体濒临死亡,血细胞密度虽然增加,但细胞的活性及细胞内用来清除有害物质或使机体复原的活性因子却已经丧失了作用。此时机体在某种机制的调动下,希望通过增加血细胞的数量,来弥补显著丧失了能使机体复原或降低亚硝酸氮毒性的因子所起到的作用。

3.3 亚硝态氮和氨态氮急性胁迫下曼氏无针乌贼幼体血液生化指标的变化

血糖是一类对动物体各组织器官的生理功能具有极其重要意义的碳水化合物。氨胁迫会促使血糖浓度升高^[22],升高的血糖主要作用是促进铵离子的排放提供能量^[23]。而另有研究认为,过高浓度的氨会引起大西洋鲑鱼 (*Gadus morhua*) 血糖浓度的降低,同时该作者推测食物摄入不足是主要原因之一^[24]。在本研究中,血糖在氨态氮胁迫 12 h 时出现升高,旨在为机体代谢解毒提供能量。而亚硝酸氮胁迫后,血糖却并未发生显著变化,因此推测乌贼血液中的血糖不能够作为亚硝酸胁迫时的指示物。

谷丙转氨酶与谷草转氨酶主要分布在肝细胞内。当肝细胞发生病变或坏死时,谷丙转氨酶和谷草转氨酶在血清中浓度就会升高,且升高的程度与肝细胞受损的程度相一致^[25]。Vede 等对虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 的研究显示,亚硝态氮处理后的谷草转氨酶和谷丙转氨酶,氨态氮处理后的谷丙转氨酶均未发生显著变化,推测这并非机体死亡的主要原因^[26]。本研究中,在氨态氮胁迫下除谷草转氨酶/谷丙转氨酶比率逐步上升外,谷丙转氨酶和谷草转氨酶的含量甚至表现出下降的趋势。而亚硝酸氮处理后,谷草转氨酶在第 6 小时显著升高,最后又有所降低;谷丙转氨酶含量在第 12 小时降到最低点后,于第 24 小时再次升高,这也导致谷草转氨酶/谷丙转氨酶比率表现出先升后降的变化趋势。据此推测,肝脏受到亚硝酸氮的毒害要大于氨态氮,但此并非机体死亡的主要原因。

血浆中的中性脂肪(甘油三酯和胆固醇)和类脂(磷脂、糖脂、固醇和类固醇)是构成血脂的主要成分。其中的甘油三酯和胆固醇主要由肝脏合成^[27],且二者含量的变化可以作为评价肝功能好坏的指标^[25]。本研究中,氨态氮促使总胆固醇上升,而甘油三酯在第 6 小时出现上升后,再次降到一个较

低水平。亚硝酸氮处理后,只有甘油三酯在第24小时有所增加,而胆固醇并未表现出明显变化。这再次证明,肝细胞的损伤并未达到促进机体死亡的程度,同时也说明亚硝态氮与氨态氮的作用机理并不相同。

总蛋白含量变化有时与血糖一样可以反映机体的营养状况^[28]。随着环境中氨氮的增加,血淋巴总蛋白分解代谢变得更加旺盛,其主要作用是为渗透压调节供能^[29]。另外,氨氮胁迫下总蛋白和氧合血红蛋白发生水解,有时会伴随着自由氨基酸含量上升^[30]。本研究中,氨氮处理后总蛋白含量的变化趋势与血糖的变化趋势相反,与总胆固醇和甘油三酯的趋势相似。据此推测,蛋白与血糖在消除氨氮时发挥着互相补充的作用。总胆固醇和甘油三酯也可以作为氨氮胁迫的指示物。Cheng等的研究显示,斑节对虾(*Penaeus monodon*)血淋巴蛋白含量随着环境亚硝酸氮浓度和处理时间的增加而减少^[21]。而本研究中,亚硝酸氮导致总蛋白含量升高是否与血细胞密度的增加有关,此方面的研究还有待深入进行。

通讯作者简介:施兆鸿(1958—)男,研究员,主要从事海水鱼类生物学,繁殖生态生理,养殖生态生理等方面的研究。

参考文献:

- [1] 王文琪,姜令绪,杨宁,等. 氨氮对菲律宾蛤仔免疫力影响[J]. 海洋科学, 2007, 31(1): 23—27
Wang W Q, Jiang L X, Yang N, et al. The effect of ammonia-N on immune activity of *Ruditapes philippinarum* [J]. *Marine Sciences* 2007, 31(1): 23—27 (in Chinese)
- [2] 张亚娟,刘存歧,王军霞,等. 氨态氮和亚硝态氮对日本沼虾血细胞数量及血红蛋白含量的影响[J]. 四川动物, 2008, 27(5): 853—854
Zhang Y J, Liu C Q, Wang J X, et al. Effects of ammonia-N and nitrite-N on THC and hemocyanin content of *Macrobrachium nipponense* [J]. *Sichuan Journal of Zoology* 2008, 27(5): 853—854 (in Chinese)
- [3] Huchette SM H, Koh C S, Day RW. Growth of juvenile blacklip abalone (*Haliotis rubra*) in aquaculture tanks: Effects of density and ammonia [J]. *Aquaculture* 2003, 219(1—4): 457—470
- [4] 吴进锋,陈素文,陈利雄,等. 硫化物和氨对西施舌幼贝的毒性影响研究[J]. 热带海洋学报, 2006, 25(1): 42—46
Wu J F, Chen S W, Chen L X, et al. Studies on toxicity of sulfide and ammonia to spat of *Cochlicopa antillarum* [J]. *Journal of Tropical Oceanography* 2006, 25(1): 42—46 (in Chinese)
- [5] 罗杰,杜涛,刘楚吾,等. 不同盐度、PH条件下氨氮对管角螺稚贝毒性影响[J]. 动物学杂志, 2010, 45(3): 102—109
Luo J, Du T, Liu C W, et al. Toxic effects of ammonia to *Hemifusus tuba* juveniles at different PH and salinity [J]. *Chinese Journal of Zoology* 2010, 45(3): 102—109 (in Chinese)
- [6] 陈金凤,黄鹤忠,徐汗富,等. 氨氮对文蛤存活及能量收支的影响[J]. 海洋科学, 2010, 34(3): 40—46
Chen J F, Huang H Z, Xu H F, et al. Ammonia effects on the survival and the energy budget of clam *Meretrix meretrix* [J]. *Marine Sciences* 2010, 34(3): 40—46 (in Chinese)
- [7] 樊甄姣,刘志鸿,杨爱国. 氨氮对栉孔扇贝血淋巴活性氧含量和抗氧化酶活性的影响[J]. 海洋水产研究, 2005, 26(1): 23—27
Fan Z J, Liu Z H, Yang A G. Effect of ammonia-N on the content of ROIs and the activities of antioxidant enzyme in the haemolymph of *Chlamys farreri* [J]. *Marine Fisheries Research* 2005, 26(1): 23—27 (in Chinese)
- [8] 樊甄姣,夏灵敏,吴常文,等. 亚硝酸氮对曼氏无针乌贼幼体的急性毒性及免疫系统的影响[J]. 河北渔业, 2009, (187): 8—11
Fan Z J, Xia L M, Wu C W, et al. The acute toxicity of $\text{NO}_2\text{-N}$ on *Sepiella mandroni* juvenile and effects of $\text{NO}_2\text{-N}$ on enzyme activity [J]. *Hebei Fisheries* 2009, (187): 8—11 (in Chinese)
- [9] 张建设,吴常文,常抗美,等. 曼氏无针乌贼血细胞形态观察及吞噬性能的研究[J]. 海洋科学, 2007, 31(11): 61—66
Zhang J S, Wu C W, Chang K M, et al. Morphologic observation and phagocytosis property of the haemocytes of *Sepiella mandroni* [J]. *Marine Sciences* 2007, 31(11): 61—66 (in Chinese)
- [10] Afonso E G, Polez V L P, Corra C F, et al. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Coppsoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 2002, 133(3): 375—382
- [11] Paterson B D, Rimmer M A, Meikle G M, et al. Physiological responses of the Asian sea bass *Lateolabrax japonicus* to water quality deterioration during simulated live transport: Acidosis, red cell swelling and levels of ions and ammonia in the plasma [J]. *Aquaculture* 2003, 218(1—4): 717—728
- [12] Foss A, Inslan A K, Roth B, et al. Interactive effects of oxygen saturation and ammonia on growth and blood physiology in juvenile turbot [J]. *Aquaculture* 2007, 271(1—4): 244—251
- [13] Cavalli R Q, Beghe E V, Lavens P, et al. Ammonia

- toxicity as a criterion for the evaluation of larval quality in the prawn *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 2000 125(3): 333—343
- [14] 徐怡, 刘其根, 胡忠军, 等. 10种农药对克氏原螯虾幼虾的急性毒性[J]. *生态毒理学报*, 2010 5(1): 50—56
Xu Y, Liu Q G, Hu Z J et al. Acute toxicity of ten pesticides to larval red swamp crayfish *Procambarus clarkii* [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology* 2010 5(1): 50—56 (in Chinese)
- [15] 徐勇, 张修峰, 曲克明, 等. 不同溶氧条件下亚硝酸盐和氨氮对半滑舌鳎的急性毒性效应[J]. *海洋水产研究*, 2006 27(5): 28—33
Xu Y, Zhang X F, Qu K M et al. Acute toxic effects of nitrite and ammonia on *Cynoglossus semilaevis* at different dissolve oxygen levels [J]. *Marine Fisheries Research* 2006 27(5): 28—33 (in Chinese)
- [16] 国家环境保护局. 海水水质标准 (GB3097—1997) [S]. 北京: 中国标准出版社, 1997
- [17] 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 [J]. *Aquaculture* 2008 274(2—4): 398—407
- [18] Wang W N, Wang A L, Wang Y. Effect of supplemental l-ascorbyl-2-polyposphate in enriched live food on the antioxidant defense system of *Penaeus vannamei* of different sizes exposed to ammonia-N [J]. *Aquaculture Nutrition* 2006 12(5): 348—352
- [19] 胡义波, 王钥, 姜乃澄. 氨态氮、亚硝态氮对罗氏沼虾血细胞及超微结构的影响[J]. *浙江大学学报(理学版)*, 2005 32(6): 691—697
Hu Y B, Wang Y, Jiang N C. Effects of ammonia-N and nitrite-N on the hemocyte count and ultrastructure of *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Journal of Zhejiang University (Science Edition)*, 2005 32(6): 691—697 (in Chinese)
- [20] Jensen F B. Nitrite and red cell function in carp. Control factors for nitrite entry, membrane potassium ion permeation, oxygen affinity and methaemoglobin formation [J]. *Journal of Experimental Biology* 1990 152: 149—166
- [21] Cheng S Y, Chen J C. Hemocyanin oxygen affinity and the fractionation of oxyhemocyanin and deoxyhemocyanin for *Penaeus monodon* exposed to elevated nitrite [J]. *Aquatic Toxicology* 1999 45(1): 35—46
- [22] Weber R A, Berez Maceira J J, Garza Mart n L Q et al. Physiological stress responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) induced by acute exposure to exogenous ammonia [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 2008 151(Supplement 1): S17
- [23] Schram E, Roques J A C, Abbink W, et al. The impact of elevated water ammonia concentration on physiology, growth and feed intake of African catfish (*Clarias gariepinus*) [J]. *Aquaculture* 2010 306(1—4): 108—115
- [24] Rønnen M, Mørland A K, Stefánsson S O et al. Interactive effects of ammonia and oxygen on growth and physiological status of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) [J]. *Aquaculture* 2008 274(2—4): 292—299
- [25] 徐晓津, 徐斌, 王军, 等. 大黄鱼感染哈维氏弧菌后血液生化指标的变化及组织病理学观察[J]. *水产学报*, 2010 34(4): 618—625
Xu X J, Xu B, Wang J et al. Studies on blood chemistry indices and histopathology of *Pseudosciaena crocea* artificially challenged with *Vibrio harveyi* [J]. *Journal of Fisheries of China* 2010 34(4): 618—625 (in Chinese)
- [26] Vedel N E, Korsgaard B, Jensen F B. Isolated and combined exposure to ammonia and nitrite in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on electrolyte status, blood respiratory properties and brain glutamine/glutamate concentrations [J]. *Aquatic Toxicology* 1998 41(4): 325—342
- [27] 沈同, 王镜岩. 生物化学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1998 176—193
- [28] Pascual C, Gaxiola G, Rosas C. Blood metabolites and hemocyanin of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. The effect of culture conditions and a comparison with other crustacean species [J]. *Marine Biology* 2003 142(4): 735—745
- [29] Mugnier C, Jusou C. Combined effect of external ammonia and molt stage on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* physiological response [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 2004 309(1): 35—46
- [30] Chen J C, Chen C T, Cheng S Y. Nitrogen excretion and changes of hemocyanin, protein and free amino acid levels in the hemolymph of *Penaeus monodon* exposed to different concentrations of ambient ammonia-N at different salinity levels [J]. *Marine Ecology Progress Series* 1994 110(1): 85—94