

## 非离子氨胁迫对淡水和海水养殖凡纳滨对虾 呼吸代谢酶活力影响的比较

贾旭颖<sup>1,2,3</sup>, 国先涛<sup>2</sup>, 王芳<sup>2\*</sup>, 黄国强<sup>1</sup>

(1. 广西海洋研究所广西海洋生物技术重点实验室, 广西 北海 536000;

2. 中国海洋大学教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003;

3. 天津农学院水产学院, 天津 300384)

**摘要:** 为了探讨非离子氨胁迫对淡水和海水两种养殖条件的凡纳滨对虾呼吸代谢酶活力的影响, 在实验室条件下研究了非离子氨胁迫(0.1 mg/L 和 0.5 mg/L)后, 两种养殖条件凡纳滨对虾己糖激酶(HK)、丙酮酸激酶(PK)、乳酸脱氢酶(LDH)和琥珀酸脱氢酶(SDH)活力的变化规律, 并将两种养殖条件对虾的相关指标进行了比较。结果显示:(1)非离子氨胁迫后, 两种养殖条件凡纳滨对虾鳃 HK 活力变化显著, 而肌肉 HK 活力变化则不显著。(2)非离子氨胁迫后, 两种养殖条件凡纳滨对虾鳃 PK 活力先升高, 后逐渐恢复到正常水平; 淡水养殖对虾肌肉 PK 活力则显著升高, 而海水养殖对虾肌肉 PK 活力变化则不显著。(3)0.1 mg/L 非离子氨胁迫后, 两种养殖条件对虾鳃和肌肉 LDH 活力变化均不显著, 而 0.5 mg/L 非离子氨对两种养殖条件对虾鳃和肌肉的 LDH 活力均具有显著影响。(4)非离子氨胁迫后, 两种养殖条件对虾鳃和肌肉 SDH 活力均显著降低。研究表明, 非离子氨胁迫对淡水养殖凡纳滨对虾呼吸代谢酶活力具有显著影响; 非离子氨胁迫后, 凡纳滨对虾有氧代谢迅速减弱, 而无氧代谢在胁迫初期略有升高, 随后减弱, 推测非离子氨胁迫可能使对虾机体主要供能物质发生改变。

**关键词:** 凡纳滨对虾; 海水; 淡水; 非离子氨; 呼吸代谢酶

**中图分类号:** Q 493; S 968.22

**文献标志码:** A

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)隶属于节肢动物门(Arthropoda)、甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、对虾科(Penaeidae)、滨对虾属(*Litopenaeus*)。凡纳滨对虾具有生长快、适应性强和适盐范围广等生物学优点, 其极强的盐度耐受能力使凡纳滨对虾淡水养殖产业发展迅速<sup>[1]</sup>。随着淡化养殖技术的不断发展, 凡纳滨对虾淡水集约化养殖规模和产量逐年提高<sup>[2-4]</sup>, 并已成为中国水产养殖的支柱产业之一<sup>[5]</sup>。

氨氮是养殖环境中重要的污染物质之一, 主要来自养殖动物的代谢和残饵的分解。随着养殖时间的延长, 养殖水体中氨氮会逐渐积累, 当积累到一定量时, 会对甲壳动物的呼吸代谢、免疫、渗透调

节和生长等多个方面产生影响, 严重时会造成生物大量死亡<sup>[6-11]</sup>。水体中的氨含量是指非离子氨(NH<sub>3</sub>)和离子氨(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)的总和, 其中非离子氨是氨的主要毒物, 其含量与水体 pH、水温及含盐量有关<sup>[12-14]</sup>。非离子氨不带电荷, 具有较高脂溶性, 很容易透过细胞膜, 损伤多种器官<sup>[15]</sup>; 当水环境中非离子氨增加时, 会抑制生物自身氨的排泄, 使血液和组织中氨的浓度升高, 氧合血红蛋白浓度降低, 削弱对虾的呼吸机能和血液的载氧能力, 造成组织缺氧<sup>[16]</sup>。此外, 高浓度的氨氮严重影响对虾体内酶的催化作用和细胞膜的稳定性, 从而破坏排泄系统渗透平衡<sup>[17]</sup>。因此, 在对虾养殖过程中, 尤其在淡水集约化养殖模式下, 非离子氨成为制约对虾正

收稿日期:2014-06-08 修回日期:2014-07-07

资助项目:广西海洋生物技术重点实验室开放课题(GLMBT-201301);国家“九七三”重点基础研究发展规划(2015CB010339)

通信作者:王芳, E-mail:wangfang249@ouc.edu.cn

常生长的主要因子之一。

呼吸代谢是生命体能量代谢的基本生理活动,不仅能反映生物自身的代谢特征、生理状态及营养状况,而且能够反映环境条件对生物生理活动的影响情况,是水生动物生理学研究的重要内容之一<sup>[18-19]</sup>。在机体的新陈代谢过程中,特定的酶可加速代谢物的转化以产生能量来满足机体的需求,呼吸代谢酶的活性变化是代谢能力变化的直接反映。研究非离子氨胁迫对养殖生物呼吸代谢酶活性的影响,对了解养殖生物对环境变化的生理响应具有重要意义。

本实验以凡纳滨对虾为实验材料,研究非离子氨胁迫后淡水养殖凡纳滨对虾呼吸代谢酶活力的变化规律,并与海水养殖条件下的相关指标进行比较,以期对凡纳滨对虾淡水养殖产业的发展提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验虾的来源及暂养

实验所用凡纳滨对虾源于青岛胶州养虾场(盐度 18~20),为体长(8.69±0.27)cm,体色透明、健康活泼的个体。对虾运回实验室后,于室内玻璃钢水槽(7 000 L)中暂养 7 d,暂养水体的盐度为 18,水温(22.0±0.5)℃,光照周期 14L:10D,连续充气,每天换水 1/2,每天 6:00 和 18:00 定时投喂人工配合饲料,饲料化学成份为水分(8.41%±0.06%)、粗蛋白(43.39%±0.22%)、脂肪(9.74%±0.30%)、灰分(9.91%±0.05%)。

### 1.2 实验虾的驯化

对虾适应实验室条件后,取 500 尾对虾,每天换水时加入适量海水升高盐度 2~3 逐渐驯化至盐度 30。另取 500 尾对虾,每天换水时加入适量淡水降低盐度 2~3 逐渐驯化至盐度 5,然后每天降低盐度 0.5~1,直到盐度为 0。对虾驯化至目标盐度后继续饲养 30 d 至实验开始。驯化期间的养殖用水为砂滤自然海水和曝气的自来水,其他养殖条件与暂养期间的相同。

### 1.3 实验设计

实验所设非离子氨浓度为 0.1 mg/L 和 0.5 mg/L。为消除对虾自身代谢产物和昼夜节律对实验结果的影响,将养殖过程中所用的天然海水和曝气后的自来水做为对照组(对照组中非离子氨含量未检出),故实验共设置了对照组、0.1 mg/L

和 0.5 mg/L 3 个处理组。实验容器为 60 L 的玻璃钢水槽,将在淡水和海水养殖条件下驯化好的对虾停食 24 h,然后分别放入对照组以及非离子氨浓度为 0.1 mg/L 和 0.5 mg/L 的水体中。每个浓度组设置 10 个水槽,每个水槽放 8 尾对虾。分别于非离子氨胁迫后 0、1、3、6、12、24 h 和 48 h 取样,在对照组和两个处理组中,每组各随机选取 10 尾处于蜕皮间期的对虾。实验期间温度为(22.0±0.5)℃,不投喂,12 h 换水一次,及时清污。因实验过程中不充气,故每 2~3 h 监测水温、pH、溶解氧和氨氮浓度,如发现氨氮和非离子氨浓度出现变化,则通过换水方式调节,以保持水体非离子氨浓度不变以及充足的溶解氧。

非离子氨浓度用氯化铵溶液调控。实验前用干燥的氯化铵配成 50 g/L 储备液备用,根据实验用水的 pH 值、盐度和温度,利用以下公式求出非离子氨(NH<sub>3</sub>-N<sub>m</sub>)在总氨氮(NH<sub>3</sub>-N<sub>t</sub>)中所占的比例,并确定每个浓度所需氯化铵储备液的体积:

$$pKa^{S,T} = 9.24 + 0.003\ 091S + 0.032\ 4(298 - T)^{[13]}$$

$$NH_3 - N_m (\%) = 100 / (1 + 10^{pKa^{S,T} - pH + rH^+})^{[13]}$$

式中, $T$ 表示绝对温度( $T = 273 + t$ ), $t$ 为摄氏温度; $S$ 代表盐度; $pKa^{S,T}$ 为电离常数; $rH^+$ 为离子活度。

### 1.4 样品的采集与测定

用吸水纸吸干对虾的体表水分后,在冰盘上迅速解剖,去壳,取对虾的鳃和肌肉,放入 1.5 mL 的离心管中,迅速放入液氮,然后转入 -80℃ 冰箱保存待测。取 0.1~0.3 g 对虾的待测组织,剪碎,加入 9 倍的 4℃ 生理盐水(0.86%),制成 10% 组织匀浆液,在 3 000 × g 离心 10 min,取上清液分装待测。

己糖激酶活力采用 6-磷酸葡萄糖脱氢酶偶联比色法测定<sup>[20]</sup>。丙酮酸激酶活力采用 Valentine 等的方法测定<sup>[21]</sup>。乳酸脱氢酶活力利用 Thébault 的方法测定<sup>[22]</sup>。琥珀酸脱氢酶活力利用检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),琥珀酸脱氢酶催化底物反应,黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)是该反应的辅基,FAD 被还原成还原黄素腺嘌呤二核苷酸(FADH),该反应与 2,6-二氯苯酚醌酸钠(2,6-DPIP)的还原相偶联,测定 2,6-DPIP 的还原速度可以推算出 SDH 的活力。单位定义为:在 37℃ 条件下每毫克蛋白每分钟使反应体系的吸光度降低 0.01 为一个酶活力单位。

组织总蛋白含量采用考马斯亮兰法测定<sup>[23]</sup>。

水体氨氮含量采用改良的纳氏试剂法测定<sup>[24-25]</sup>。

### 1.5 数据处理与分析

实验结果以平均值 ± 标准误 (mean ± SE) 表示。所得数据分析采用 SPSS 16.0 统计软件,通过多因素方差分析 (Three-way ANOVA) 及 SNK 多重比较分析处理,以  $P < 0.05$  作为差异显著水平。海水与淡水间的差异通过 Independent-samples  $t$ -test 分析处理,以  $P < 0.05$  作为差异显著水平。

## 2 结果

### 2.1 非离子氨胁迫对凡纳滨对虾己糖激酶 (HK) 活力的影响

对照组中,两种养殖条件对虾鳃 HK 活力随时间变化不显著 ( $P > 0.05$ ); 实验期间淡水对虾酶活力显著低于海水对虾 ( $P < 0.05$ )。0.1 mg/L 处理组中,淡水养殖对虾鳃 HK 活力先升高后下降,酶活力在胁迫后 3 ~ 6 h 显著升高,随后酶活

力小幅下降,胁迫后 3 ~ 48 h 酶活力显著高于 0 h ( $P < 0.05$ ); 而海水养殖对虾鳃 HK 活力略有升高,但是胁迫后各时间点酶活力差异不显著 ( $P > 0.05$ )。0.5 mg/L 处理组中,两种养殖条件对虾鳃 HK 活力变化趋势基本相似,均在胁迫初期显著升高,胁迫后期酶活力基本稳定,并维持在较高的水平。 $t$  检验结果显示,在 0.1 mg/L 处理组的 0、1 和 12 h 以及 0.5 mg/L 处理组的 0、1 和 3 h,淡水养殖对虾鳃 HK 活力显著低于海水养殖对虾 ( $P < 0.05$ ) (图 1-a, b, c)。

对照组中,两种养殖条件对虾肌肉 HK 活力随时间变化不显著 ( $P > 0.05$ ); 实验期间淡水对虾酶活力低于海水对虾,但差异不显著 ( $P > 0.05$ )。两种浓度非离子氨胁迫后,淡水和海水养殖对虾肌肉 HK 活力均呈现先升高后小幅下降的趋势,并且胁迫后各时间点酶活力差异不显著 ( $P > 0.05$ )。非离子氨胁迫期间淡水养殖对虾肌肉 HK 活力均低于海水养殖对虾,但是差异不显著 ( $P > 0.05$ ) (图 1-d, e, f)。

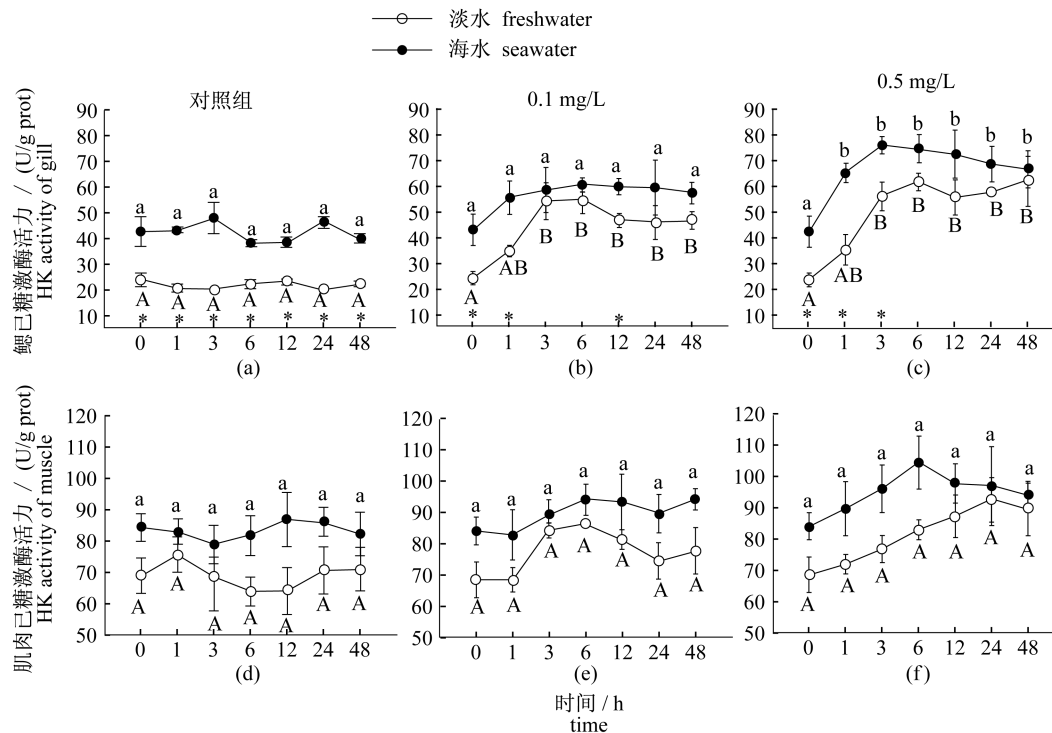


图 1 非离子氨胁迫对凡纳滨对虾己糖激酶活力的影响

图中数据为平均值 ± 标准误。“\*”表示在相同的时间下,海水和淡水养殖对虾的差异显著;不同的小写字母表示海水养殖对虾不同时间的差异显著,不同的大写字母表示淡水养殖对虾不同时间的差异显著。下同

Fig. 1 Effects of NH<sub>3</sub>-N on HK activity of *L. vannamei*

Values are mean ± SE, “\*” means the significant differences between seawater and freshwater at the same time. Different lowercase mean significant differences among different exposure times in seawater group, whereas different capital letters mean significant differences among different exposure times in freshwater group. The same as below

多因素方差分析显示,养殖条件、非离子氨浓度和胁迫时间对凡纳滨对虾鳃组织中 HK 活力具有显著影响 ( $P < 0.05$ ); 养殖条件和非离子氨浓度对肌肉 HK 活力影响显著 ( $P < 0.05$ ), 而胁迫时间对其影响不显著 ( $P > 0.05$ ); 三者的交互作用对两种组织中该种酶活力影响均不显著 ( $P > 0.05$ )。

## 2.2 非离子氨胁迫对凡纳滨对虾丙酮酸激酶 (PK) 活力的影响

对照组中, 两种养殖条件对虾鳃 PK 活力随时间变化不显著 ( $P > 0.05$ ); 实验期间淡水对虾酶活力显著低于海水对虾 ( $P < 0.05$ )。0.1 mg/L 非离子氨胁迫后, 两种养殖条件对虾鳃 PK 活力变化规律相似, 均在胁迫初期 (1~3 h) 显著升高, 随后下降。在胁迫后期 PK 活力基本恢复到起始水平。0.5 mg/L 非离子氨胁迫后, 两种养殖条件对虾鳃 PK 活力均呈现先升高后降低的趋势, 胁迫后期 PK 活力略低于胁迫前, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ )。t 检验结果显示, 0.1 mg/L 处理组的 0、1、6 和 12 h 以及 0.5 mg/L 处理组的 0、1、12 和 24 h, 淡水养殖对虾鳃 PK 活力显著低于海水养殖对虾 ( $P < 0.05$ ) (图 2-a, b, c)。

对照组中, 两种养殖条件对虾肌肉 PK 活力随时间变化不显著 ( $P > 0.05$ ); 实验期间淡水对虾酶活力显著低于海水对虾 ( $P < 0.05$ )。0.1 mg/L 非离子氨胁迫后, 淡水养殖对虾肌肉 PK 活力先升高后下降, 酶活力在胁迫后 3 h 达到峰值, 随后下降, 实验结束时 (48 h) 酶活力高于 0 h, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ ); 海水养殖对虾肌肉 PK 活力虽略有升高, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ )。0.5 mg/L 非离子氨胁迫后, 淡水养殖对虾肌肉 PK 活力显著升高, 12~48 h 有所下降, 但酶活力仍显著高于 0 h 的水平 ( $P < 0.05$ ); 而海水养殖对虾 PK 活力有所升高, 但是各时间点酶活力差异不显著 ( $P > 0.05$ )。t 检验结果显示, 0.1 mg/L 非离子氨胁迫 6 h 和 0.5 mg/L 非离子氨胁迫 3 h, 淡水养殖对虾肌肉 PK 活力显著低于海水养殖对虾 ( $P < 0.05$ ) (图 2-d, e, f)。

多因素方差分析显示, 养殖条件、非离子氨浓度和胁迫时间对凡纳滨对虾鳃和肌肉组织中 PK 活力均具有显著影响 ( $P < 0.05$ ), 但是三者的交互作用对两种组织中 PK 活力影响均不显著 ( $P > 0.05$ )。

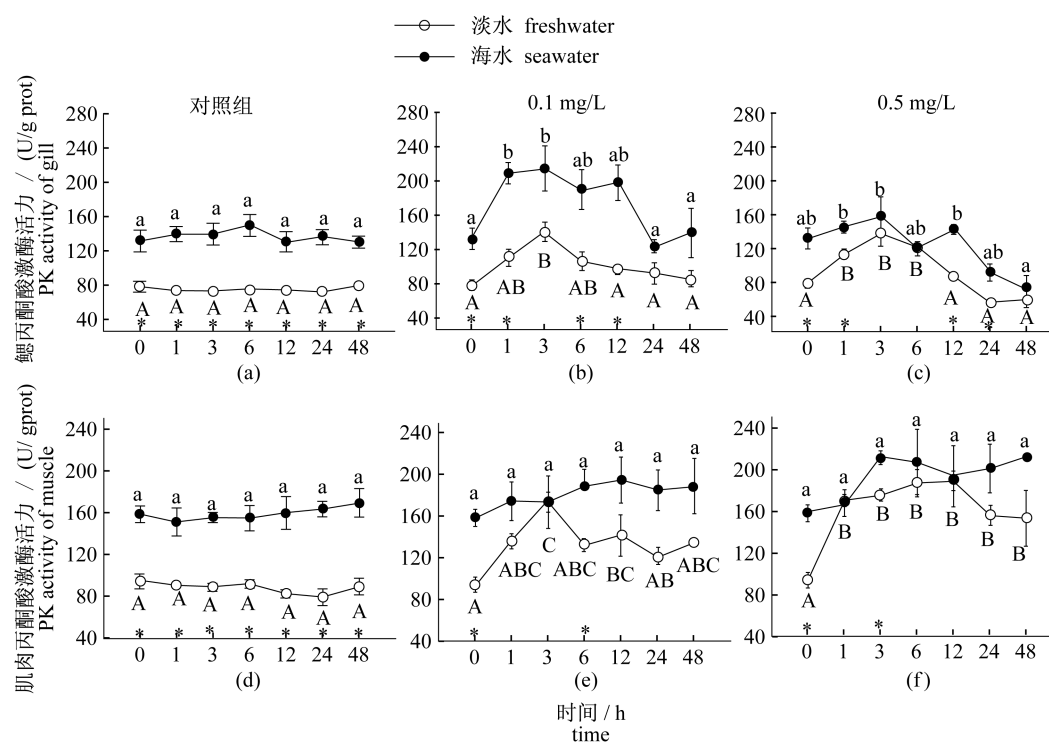


图2 非离子氨胁迫对凡纳滨对虾丙酮酸激酶活力的影响

Fig. 2 Effects of  $\text{NH}_3\text{-N}$  on PK activity of *L. vannamei*

### 2.3 非离子氨胁迫对凡纳滨对虾乳酸脱氢酶(LDH)活力的影响

对照组中,两种养殖条件对虾鳃 LDH 活力随时间变化不显著( $P > 0.05$ );两种养殖条件对虾鳃 LDH 活力差异不显著( $P > 0.05$ )。0.1 mg/L 非离子氨胁迫后,淡水养殖对虾鳃 LDH 活力呈不规则波动,且胁迫后各时间点酶活力差异不显著( $P > 0.05$ );海水养殖对虾鳃 LDH 活力基本呈现先升高,后降低的变化趋势,但是各时间点酶活力差异不显著( $P > 0.05$ )。0.5 mg/L 非离子氨胁迫后,淡水养殖对虾鳃 LDH 活力在 1 h 处有小幅升高,随后酶活力下降,胁迫后 24~48 h 酶活力基本稳定,显著低于 0 h 的酶活力( $P < 0.05$ );海水养殖对虾鳃 LDH 活力略有波动,但是并未造成显著性差异( $P > 0.05$ )。0.1 mg/L 非离子氨胁迫期间,两种养殖条件对虾鳃 LDH 活力差异不显著( $P > 0.05$ ),0.5 mg/L 非离子氨胁迫后的 48 h,海水养殖对虾鳃 LDH 活力显著高于淡水养殖对虾( $P < 0.05$ ) (图 3-a,b,c)。

对照组中,两种养殖条件对虾肌肉 LDH 活力

随时间变化不显著( $P > 0.05$ );实验期间淡水对虾酶活力显著高于海水对虾( $P < 0.05$ )。0.1 mg/L 非离子氨胁迫后,淡水和海水养殖对虾肌肉 LDH 活力变化均不显著( $P > 0.05$ )。0.5 mg/L 非离子氨胁迫后,两种养殖对虾肌肉 LDH 活力均在 1 h 明显升高,随后下降。 $t$  检验结果显示,0.1 mg/L 非离子氨胁迫后的 0、1、6 和 12 h,淡水养殖对虾酶活力显著高于海水养殖对虾( $P < 0.05$ ),0.5 mg/L 非离子氨胁迫前,淡水养殖对虾肌肉 LDH 活力显著高于海水对虾( $P < 0.05$ ),而胁迫后 48 h,淡水养殖对虾酶活力则略低于海水养殖对虾(图 3-d,e,f)。

多因素方差分析显示,养殖条件和非离子氨浓度对凡纳滨对虾鳃中 LDH 活力影响不显著( $P > 0.05$ ),但胁迫时间对鳃中该酶活力影响显著( $P < 0.05$ );养殖条件、非离子氨浓度和胁迫时间对凡纳滨对虾肌肉 LDH 活力均具有显著影响( $P < 0.05$ );三者的交互作用对两种组织中该种酶活力影响均不显著( $P > 0.05$ )。

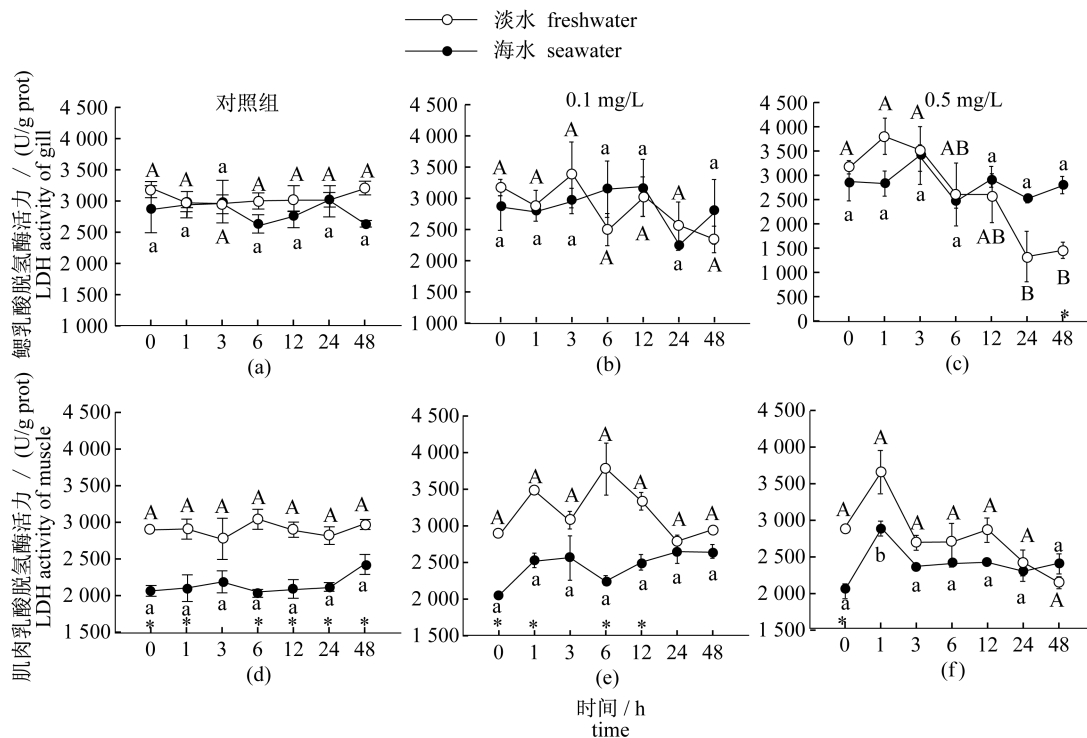


图 3 非离子氨胁迫对凡纳滨对虾乳酸脱氢酶活力的影响

Fig. 3 Effects of NH<sub>3</sub>-N on LDH activity of *L. vannamei*

### 2.4 非离子氨胁迫对凡纳滨对虾琥珀酸脱氢酶(SDH)活力的影响

对照组中,两种养殖条件对虾鳃 SDH 活力随时间变化不显著( $P > 0.05$ );实验期间淡水对虾

酶活力略低于海水对虾( $P > 0.05$ )。0.1 mg/L 非离子氨胁迫后,淡水和海水养殖对虾鳃 SDH 活力均大幅下降,胁迫后 6 h 达到最低点,之后小幅回升,48 h 酶活力仍显著低于对应的 0 h 酶活力

( $P < 0.05$ )。0.5 mg/L 非离子氨胁迫后,淡水和海水养殖对虾鳃 SDH 活力均显著下降,在 12 h 下降到最低点,随后略有回升,胁迫后 3~48 h 的酶活力均显著低于对应的 0 h 酶活力水平( $P < 0.05$ )。t 检验结果表明,0.1 mg/L 和 0.5 mg/L 非离子氨胁迫 48 h,淡水养殖对虾鳃 SDH 活力显著低于海水养殖对虾( $P < 0.05$ ) (图 4-a, b, c)。

对照组中,两种养殖条件对虾肌肉 SDH 活力随时间变化不显著( $P > 0.05$ );实验期间淡水养殖对虾酶活力略低于海水对虾( $P > 0.05$ )。0.1 mg/L 非离子氨胁迫后,淡水和海水养殖对虾肌肉 SDH 活力变化规律相似,均呈现先下降后回升的趋势,酶活力均在 6 h 下降到最低点,随后有所回升,胁迫后各时间点酶活力显著低于胁迫 0 h

( $P < 0.05$ )。0.5 mg/L 非离子氨胁迫 1~3 h,淡水和海水养殖对虾肌肉 SDH 活力缓慢下降,3 h 后酶活力剧烈下降,24~48 h 酶活力基本稳定,胁迫后 48 h,淡水和海水养殖对虾酶活力显著低于相应的 0 h 酶活力( $P < 0.05$ )。t 检验结果表明,0.1 mg/L 非离子氨胁迫的 3、6、24 和 48 h,淡水养殖对虾肌肉 SDH 活力显著低于海水养殖对虾( $P < 0.05$ );0.5 mg/L 非离子氨胁迫期间,淡水养殖对虾肌肉 SDH 活力与海水养殖对虾相比,无显著差异( $P > 0.05$ ) (图 4-d, e, f)。

多因素方差分析显示,养殖条件、非离子氨浓度和胁迫时间对凡纳滨对虾鳃和肌肉组织中 SDH 活力均具有显著影响( $P < 0.05$ ),但是三者的交互作用对两种组织中该种酶活力影响均不显著( $P > 0.05$ )。

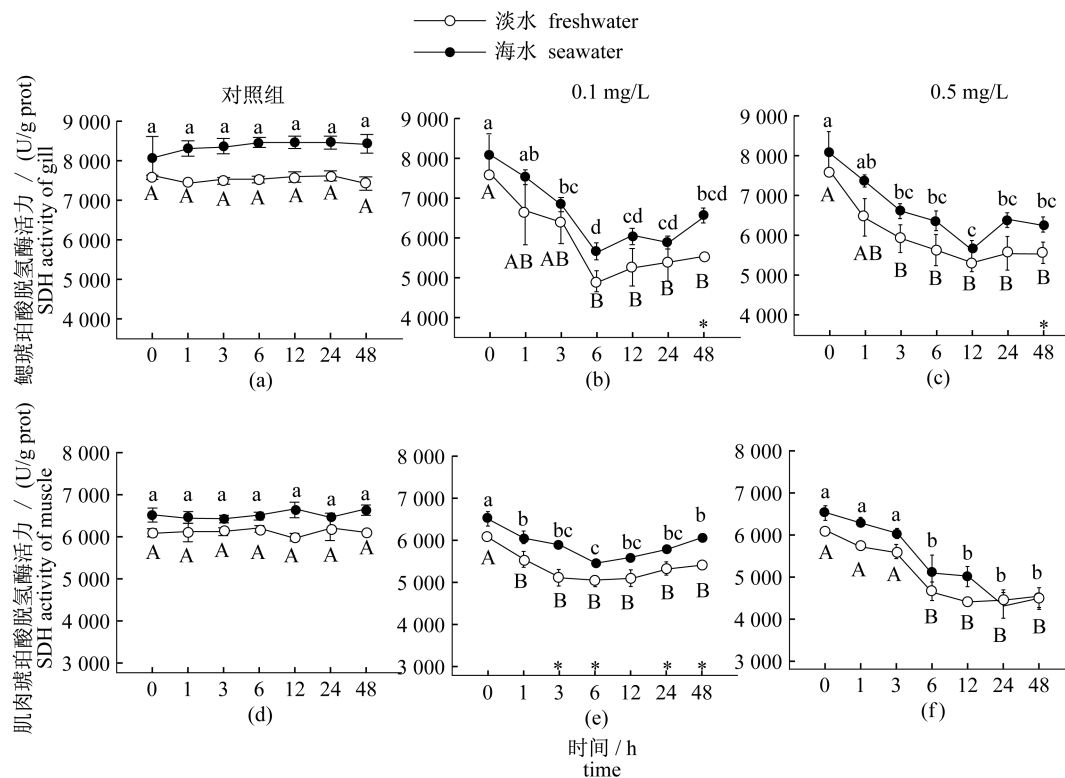


图 4 非离子氨胁迫对凡纳滨对虾琥珀酸脱氢酶活力的影响

Fig. 4 Effects of  $\text{NH}_3\text{-N}$  on SDH activity of *L. vannamei*

### 3 讨论

养殖环境中的氨氮通常指的是总氨即非离子氨( $\text{NH}_3$ )和离子氨( $\text{NH}_4^+$ )。其中氨氮的毒性主要由  $\text{NH}_3$  产生,  $\text{NH}_3$  不带电荷, 具有较高的脂溶性, 很容易透过细胞膜, 对组织产生毒害作用。当生物体应对环境胁迫或受到有毒物质的毒害时, 必然导致机体能量需求的增加。机体内主要提供

能量的物质是葡萄糖, 而糖酵解过程是生物细胞糖代谢过程的第一步, 在该过程中, 葡萄糖会经过酶促反应转变成丙酮酸, 其中 HK 和 PK 是反应过程中的关键酶, 其活性的变化不仅对维持机体血糖水平具有重要作用, 而且直接影响着整个糖代谢途径的速度和方向<sup>[26]</sup>。氨氮胁迫会引起生物体对能量需求的增加, 这就会导致机体内与能量代谢相关的酶活性产生变化。对刺参

(*Apostichopus japonicus*) 的研究表明,低浓度短时间的氨氮胁迫会提高刺参体内 HK 的活性,然而随着氨氮浓度的增大和胁迫时间的延长, HK 活性显著下降<sup>[27]</sup>。目前关于氨氮或者非离子氨对甲壳动物呼吸代谢酶活性影响的研究还比较少,但是通过已有的研究,可以发现环境胁迫例如温度突变、盐度和光照均会对甲壳动物体内 HK 和 PK 活性产生影响<sup>[19,28-29]</sup>。对日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 和中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 的研究发现,两种对虾在高浓度 NH<sub>3</sub> 条件下,耗氧率增加,能量消耗增多<sup>[30-32]</sup>。本研究中,非离子氨胁迫初期,淡水和海水养殖对虾鳃和肌肉中 HK 和 PK 活力均有不同程度的升高,说明短时间的非离子氨胁迫使对虾机体提高了对葡萄糖的利用效率,糖酵解作用增强,从而产生更多的能量来满足机体抵抗非离子氨的毒性和加快自身解毒功能过程中能量的需要;随着胁迫时间的延长, HK 和 PK 活力有所下降,可能是与糖异生作用加强有关,机体通过糖酵解和糖异生这两个相对立的过程来保持葡萄糖水平的动态平衡。胁迫初期,糖酵解作用加剧,机体葡萄糖大量消耗,胁迫后期,对虾中毒程度加深,使得 HK 活性受到严重抑制,通过机体自身的生理调节已无法维持其葡萄糖供应,造成葡萄糖含量显著降低,需要通过糖异生作用来补充,所以糖酵解作用减弱,最终导致其能量代谢能力下降。

LDH 是机体糖代谢中无氧代谢过程中重要的调节酶之一,糖酵解产生的丙酮酸在 LDH 催化下还原成乳酸,使得糖酵解产生 ATP 的途径得以顺利进行,而乳酸又必须在 LDH 的作用下氧化成丙酮酸方可进入线粒体进行三羧酸 (TCA) 循环<sup>[33]</sup>, LDH 活力的大小,在一定程度上反映了无氧代谢能力的高低<sup>[34]</sup>。SDH 不仅是 TCA 循环中的关键酶而且是呼吸链的第 1 个酶,是反映线粒体功能的标志酶之一,其活力可在一定程度上反映机体有氧代谢的水平<sup>[26]</sup>。本研究中,低浓度非离子氨胁迫后,淡水和海水养殖对虾 LDH 活力变化不显著 ( $P > 0.05$ ),而高浓度非离子氨胁迫后,淡水养殖对虾鳃和肌肉中 LDH 活力均在 1 h 处升高,随后下降,48 h 酶活力低于胁迫前的水平,而高浓度胁迫 48 h,海水养殖对虾 LDH 活力低于胁迫前的水平。说明高浓度非离子氨胁迫后,淡水养殖对虾无氧呼吸作用略有提高,但是随着胁

迫时间的延长,无氧呼吸开始减弱。非离子氨胁迫后,对虾体内 SDH 活力先下降后略有回升,48 h 的酶活力仍显著低于胁迫前的水平,说明非离子氨胁迫后,对虾有氧呼吸受到抑制,有氧代谢产能降低,这是由对虾组织缺氧所造成。研究表明,水体中 NH<sub>3</sub> 浓度过高时,对虾体内 NH<sub>3</sub> 排泄受到抑制,血淋巴中 NH<sub>3</sub> 浓度升高,血蓝蛋白含量降低,游离氨基酸含量升高,血液载氧能力下降,导致组织缺氧,从而造成对虾耗氧率增加<sup>[16,35]</sup>。对三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 和日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 的研究表明,胁迫条件下 (盐度、光照和硫化物) 机体通过提高 LDH 的活力进而提高无氧代谢能力来满足机体对能量的需求<sup>[19,29,36]</sup>。但是本研究结果显示,非离子氨胁迫初期,对虾无氧代谢略有增强,而胁迫后期机体无氧呼吸基本恢复到正常水平或降低到正常水平以下,但有氧呼吸并未完全恢复,此时机体需要通过自我调节,寻求新的供能物质来补充糖类供能不足。Racotta 等<sup>[37]</sup> 比较了氨氮胁迫 24 h 前后凡纳滨对虾乳酸、糖原、酰基甘油和胆固醇的含量,发现高浓度氨氮胁迫通过厌氧代谢降低了对碳水化合物的使用率同时增加了脂肪的使用率以满足代谢需要。可以推测,随着非离子氨胁迫时间的延长和浓度的增加,对虾机体通过无氧代谢供能能力减弱,同时增加了脂肪的使用率来补充糖类供能的不足。关于氨氮胁迫对甲壳动物能量代谢方式的影响及其机制,还需要更进一步的研究。

本研究中,对虾 HK 和 PK 活力对非离子氨的响应具有组织特异性,与肌肉组织相比,鳃组织 HK 和 PK 活力对非离子氨更加敏感,这与对虾体内氨氮解毒代谢途径有关,鳃进行离子转运和排泄的水平较高,其体内 60%~70% 的氮是以氨氮形式由鳃排出体外,10% 以氨基酸形式排泄,还有少数氮以尿素和尿酸形式排出体外<sup>[38-40]</sup>,鳃是对虾最主要的排氮器官,对能量的需求较大,同时也是直接接触水体中非离子氨的器官,所以最易受水体中非离子氨的损害,其组织中的呼吸代谢酶活力也较易受到非离子氨的影响。

养殖水体中,氨氮浓度随养殖进程逐渐增高,杨逸萍等<sup>[41]</sup> 研究发现对虾养殖池氨氮 (TAN) 浓度为 40~140 μg/L,池底质间隙水为 2 mg/L,可见池底氨氮浓度远高于养殖池的氨氮浓度。对虾习性为底栖生活,且许多种类具有潜沙习性,池底

非离子氨浓度过高势必会对凡纳滨对虾的能量代谢造成严重影响,减弱对虾有氧代谢能力,可能使对虾机体主要供能物质发生改变。水体中非离子氨占总氨氮的比例与水体温度、盐度和 pH 密切相关,尤其是 pH 的影响甚是显著,其比例随 pH 升高而呈明显的增高趋势。此外,与海水养殖凡纳滨对虾相比,淡水养殖对虾呼吸代谢酶活力变化更易受非离子氨胁迫的影响。因此,在对虾养殖过程中,特别是淡水集约化养殖过程中,不仅要控制水体中氨氮浓度,更要保持水温和盐度稳定,在合适的范围内尽可能将 pH 稳定在较低水平,从而减小氨氮,特别是非离子氨对养殖对虾产生的危害。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Hu C Q, Shen Q, Zhang L P, *et al.* Present Status and Prospect of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* culture in China [ C ]. China/FAO/NACA Workshop on “Healthy, Safe and Environmentally Sound Shrimp Farming”. Beijing: China Society of Fisheries, 2004: 72 – 82.
- [ 2 ] Saoud I S, Davis D A, Rouse D B. Suitability studies of inland well waters for *Litopenaeus vannamei* culture [ J ]. Aquaculture, 2003, 217 ( 1 ): 373 – 383.
- [ 3 ] Cheng K M, Hu C Q, Liu Y N, *et al.* Effects of dietary calcium, phosphorus and calcium/phosphorus ratio on the growth and tissue mineralization of *Litopenaeus vannamei* reared in low-salinity water [ J ]. Aquaculture, 2006, 251 ( 2 ): 472 – 483.
- [ 4 ] Araneda M, Perez E P, Gasca-Leyva E. White shrimp *Penaeus vannamei* culture in freshwater at three densities: condition state based on length and weight [ J ]. Aquaculture, 2008, 283 ( 1 ): 13 – 18.
- [ 5 ] Ministry of Agriculture, Fisheries Bureau. 2013 China fishery statistical yearbook [ M ]. Beijing: China Agriculture Press, 2013. [ 农业部渔业局. 2013 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2013. ]
- [ 6 ] Chen J C, Nan F H. Effects of ammonia on oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Penaeus chinensis* after prolonged exposure to ammonia [ J ]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1993, 51 ( 1 ): 122 – 129.
- [ 7 ] Chen J C, Cheng S Y, Chen C T. Changes of haemocyanin, protein and free amino acid levels in the haemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia [ J ]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology, 1994, 109 ( 2 ): 339 – 347.
- [ 8 ] Chen J C, Chen C T. Changes of Osmotic and Electrolyte Concentrations in the haemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to Ambient Ammonia [ J ]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology, 1996, 114 ( 1 ): 35 – 38.
- [ 9 ] Rebelo M F, Rodriguez E M, Santos E A. Histopathological changes in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* ( Crustacea- Decapoda ) following acute exposure to ammonia [ J ]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology, 2000, 25 ( 2 ): 157 – 164.
- [ 10 ] Cheng W, Chen J C. The virulence of *Enterococcus* to freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its immune resistance under ammonia stress [ J ]. Fish & Shellfish Immunology, 2002, 12 ( 2 ): 97 – 109.
- [ 11 ] Koo J G, Kim S G, Jee J H. Effects of ammonia and nitrite on survival, growth and molting in juvenile tiger crab, *Orithyia sinica* ( Linnaeus ) [ J ]. Aquaculture Research, 2005, 36 ( 1 ): 79 – 85.
- [ 12 ] Sun J J, Ding M L. Effect of ammonia-N on anti-disease ability of *Penaeus chinensis* [ J ]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1999, 30 ( 3 ): 267 – 272. [ 孙舰军, 丁美丽. 氨氮对中国对虾抗病力的影响. 海洋与湖沼, 1999, 30 ( 3 ): 267 – 272. ]
- [ 13 ] Wang K X. Crustaceans: Cultivation and Proliferation [ M ]. Beijing: China Agriculture Press, 1997: 91. [ 王克行. 虾蟹类增养殖学. 北京: 中国农业出版社, 1997: 91. ]
- [ 14 ] Armstrong D A, Chippendale D, Knight A W, *et al.* Interaction of ionized and un-ionized ammonia on the short-term survival and growth of prawn larvae *Macrobrachium rosenbergii* [ J ]. Biology Bulletin, 1978, 154 ( 1 ): 15 – 31.
- [ 15 ] Colt J E, Armstrong D A. Nitrogen toxicity to crustaceans, fish and molluscs [ M ] // Allen L J, Kinney E C. Proceedings of the bio-engineering symposium for fish culture. Bethesda: Culture Section of the American Fisheries Society, 1981: 34 – 47.
- [ 16 ] Chen J C, Chen C T, Cheng S Y. Nitrogen excretion and changes of haemocyanin, 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.



- [17] Jiang L X, Pan L Q, Xiao G Q. Effects of ammonia-N immune parameters of white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2004, 11(6): 537 - 541. [姜令绪, 潘鲁青, 肖国强. 氨氮对凡纳滨对虾免疫指标的影响 [J]. 中国水产科学, 2004, 11(6): 537 - 541.]
- [18] Lin X T, Zhang Q M, Xu Z N, et al. Advancement of the study on respiratory metabolism of decapod crustaceans [J]. Journal of Fisheries of China, 2000, 24(6): 575 - 580. [林小涛, 张秋明, 许忠能, 等. 虾蟹类呼吸代谢研究进展 [J]. 水产学报, 2000, 24(6): 575 - 580.]
- [19] Lu Y L, Wang F, Gao Q F, et al. Effects of salinity on the respiratory metabolism of pre-and post-maturity swimming crab (*Portunus trituberculatus*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(9): 1392 - 1399. [路允良, 王芳, 高勤峰, 等. 盐度对三疣梭子蟹成熟前后呼吸代谢的影响. 水产学报, 2012, 36(9): 1392 - 1399.]
- [20] Tanaka K R, Valentine W N, Miwa S. Pyruvate kinase (PK) deficiency hereditary nonspherocytic hemolytic anemia [J]. Blood, 1962, 19(3): 267 - 295
- [21] Valentine W N, Oski F A, Paglia D E, et al. Hereditary hemolytic anemia with hexokinase deficiency: role of hexokinase in erythrocyte aging [J]. The New England Journal of Medicine, 1967, 276(1): 1 - 11.
- [22] Thébault M T. Lactate content and lactate dehydrogenase activity in *Palaemon serratus* abdominal muscle during temperature changes [J]. Journal of Comparative Physiology, 1984, 154: 85 - 89.
- [23] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of Protein utilizing the Principle of Protein-dye-binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1): 248 - 254.
- [24] Lei Y Z. Experiments of water environmental chemistry for aquaculture [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2006. [雷衍之. 养殖水环境化学实验. 北京: 中国农业出版社, 2006.]
- [25] Zhang Y. Treating aquaculture seawater by chemical way and improvement of detection method for ammonia-nitrogen [D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2006. [张勇. 养殖海水的化学法处理及氨氮检测方法的改进. 广州: 中山大学, 2006.]
- [26] Wang J Y, Zhu S G, Xu C F. Biochemistry [M]. 3rd ed. Beijing: Higher Education Press, 2005 [王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2005.]
- [27] Yu X Responses of *Apostichopus japonicus* (Selenka) to chemical stress factors and physiological and ecological mechanism [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011 [于晓. 刺参对几种化学胁迫因子的生理生态学响应及其机制研究. 青岛: 中国海洋大学, 2011.]
- [28] Guo B, Wang F, Hou C Q, et al. Effects of acute temperature fluctuation on HK and PK activity, HSP70 relative content in *Penaeus chinensis* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(5): 885 - 889. [郭彪, 王芳, 侯纯强, 等. 温度突变对凡纳滨对虾己糖激酶和丙酮酸激酶活力以及热休克蛋白表达的影响. 中国水产科学, 2008, 15(5): 885 - 889.]
- [29] Wang X, Wang F, Lu Y L, et al. Effects of light intensity on the respiratory metabolism of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(2): 237 - 243. [王馨, 王芳, 路允良, 等. 光照强度对三疣梭子蟹呼吸代谢的影响. 水产学报, 2014, 38(2): 237 - 243.]
- [30] Chen J C, Lai S H. Oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Penaeus japonicus* adolescents exposed to ambient ammonia [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology, 1992, 102(1): 129 - 133.
- [31] 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]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology, 1992, 102(2): 287 - 291.
- [32] Chen J C, Lin C Y. Responses of oxygen consumption, ammonia-N excretion and urea-N excretion of *Penaeus chinensis* exposed to ambient ammonia at different salinity and pH levels [J]. Aquaculture, 1995, 136(3): 243 - 255.
- [33] Viruu M. Difference in effects of various training regimens on metabolism of skeletal muscles [J]. Journal of Sports Medicine and Physical Fitness, 1994, 34(3): 217 - 227.
- [34] Zietara M S, Gronczewska J, Stachowiak K, et al. Lactate dehydrogenase in abdominal muscle of crayfish *Orconectes limosus* and shrimp *Crangon crangon* (Decapoda: Crustacea): properties and evolutionary relationship [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry &

- Molecular Biology, 1996, 114(4): 395 – 401.
- [35] Chen J C, Chen J M. Arginase specific activity and nitrogenous excretion of *Penaeus japonicus* exposed to elevated ambient ammonia [J]. Marine Ecology Progress Series, 1997, 153, 197 – 202.
- [36] Guan Y Q, Wang H C, Li L. Effects of sulphide on the enzyme of respiratory metabolism and energy metabolism of *Macrobrachium nipponense* [J]. Ecology and Environmental Sciences, 2009, 18(6): 2017 – 2012. [管越强, 王慧春, 李利. 硫化物胁迫对日本沼虾呼吸代谢和能量代谢酶的影响. 环境学报 2009, 18(6): 2017 – 2012.]
- [37] Racotta I S, Hernández-Herrera R. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2000, 125(4): 437 – 443.
- [38] Regnault M. Nitrogen excretion in marine and freshwater crustacea [J]. Biological Reviews, 1987, 62(1): 1 – 24.
- [39] Greenaway P. Nitrogenous excretion in aquatic and terrestrial crustaceans [J]. Memories of the Queensland Museum, 1991, 31: 215 – 227.
- [40] Randall D J, Tsui T K N. Ammonia toxicity in fish [J]. Marine Pollution Bulletin, 2002, 45(1): 17 – 23.
- [41] Yang Y P, Wang Z H, Sun J, et al. The variation law of aqueous chemical factors and the budgets of nitrogen in the intensive shrimp ponds [J]. Marine Sciences, 1999(1): 15 – 17. [杨逸萍, 王增焕, 孙建, 等. 精养虾池主要水化学因子变化规律和氮的收支. 海洋科学, 1999(1): 15 – 17.]

## Comparison of the effect of nonionic ammonia stress on respiratory metabolic enzyme of *Litopenaeus vannamei* in seawater and freshwater

JIA Xuying<sup>1,2,3</sup>, GUO Xiantao<sup>2</sup>, WANG Fang<sup>2\*</sup>, HUANG Guoqiang<sup>1</sup>

(1. Guangxi Key Laboratory for Marine Biotechnology, Guangxi Institute of Oceanology, Beihai 536000, China;

2. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

3. Fisheries College, Tianjin Agriculture University, Tianjin 300384, China)

**Abstract:** After nonionic ammonia stress (0.1 mg/L and 0.5 mg/L), changes of activities of hexokinase (HK), pyruvate kinase (PK), lactic dehydrogenase (LDH), and succinate dehydrogenase (SDH) were compared between *L. vannamei* long-term cultured in freshwater and in seawater. Results showed that: (1) nonionic ammonia in lower concentration induced the HK activity in gills of freshwater shrimps to a significantly higher level, while nonionic ammonia in higher concentration induced a significantly higher level of HK activity in gills of freshwater and seawater shrimps. After stress, no significant change was observed in HK activity in muscles of freshwater and seawater shrimps. (2) After nonionic ammonia stress, an increase was observed in PK activity in gills of all shrimps, and PK activity returned to the normal level at the end of the experiments. However, PK activity in muscles showed a different change: no significant change was found in seawater shrimps, which was different from that in freshwater shrimps. (3) No significant effects of nonionic ammonia in lower concentration on LDH activity in gills and muscles of freshwater and seawater shrimps were observed. In contrast, nonionic ammonia in higher concentration imposed a significant effect on LDH activity in gills and muscles of freshwater shrimps. (4) SDH activity was significantly lower in both seawater and freshwater after nonionic ammonia stress. We conclude that nonionic ammonia stress has a significant effect on respiratory metabolic enzyme activities of *L. vannamei*, and aerobic metabolism decreased drastically after nonionic ammonia stress, while anaerobic metabolism increased slightly in the initial period prior to decreasing. It was suggested that nonionic ammonia probably led to a change in main energetic materials in shrimps.

**Key words:** *Litopenaeus vannamei*; seawater; freshwater; nonionic ammonia; respiratory metabolic enzyme

**Corresponding author:** WANG Fang. E-mail: wangfang249@ouc.edu.cn