

氨氮与拥挤胁迫对吉富品系尼罗罗非鱼幼鱼生长和肝脏抗氧化指标的联合影响

强俊¹, 徐跑^{1,2*}, 何杰², 王辉³, 李瑞伟⁴

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081;

3. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025;

4. 广东茂名茂南三高罗非鱼良种基地, 广东 茂名 525024)

摘要: 采用中心复合试验设计(CCD)和响应曲面方法(response surface methodology, RSM), 探讨了氨氮(0.02~2.00 mg/L)和养殖密度(1~5尾/10 L)对吉富罗非鱼幼鱼生长和肝脏抗氧化指标的联合影响。结果表明, 本试验条件下, 氨氮和养殖密度的一次与二次效应对特定生长率有显著影响($P < 0.05$), 随着氨氮或养殖密度的上升, 特定生长率呈先上升后下降的变化。氨氮与养殖密度之间存在交互效应($P < 0.05$), 氨氮浓度为0.02~0.20 mg/L, 养殖密度在1~2尾/10 L时, 幼鱼特定生长率较高; 而氨氮浓度高于0.20 mg/L, 养殖密度在3尾/10 L左右时, 生长速度较快。肝脏丙二醛(MDA)含量随氨氮浓度和养殖密度的上升而上升, 超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)的活力呈先上升后下降的变化。氨氮与养殖密度的一次效应对MDA含量和两种酶活力均有显著影响($P < 0.05$), 二次效应对两种酶活力的表达有极显著影响($P < 0.01$); 氨氮与养殖密度对CAT活力有交互效应, 高浓度氨氮与高养殖密度环境会抑制SOD和CAT活力的表达。因子与响应值间二次多项回归方程的决定系数分别达到0.972 4、0.913 2、0.938 9和0.969 2($P < 0.01$), 可用于预测; 氨氮效应对生长和抗氧化酶活力的影响较养殖密度明显。建议在罗非鱼的养殖过程中合理安排好养殖密度, 保持溶氧充足, 降低氨氮胁迫, 提高罗非鱼的生长与抗病力。

关键词: 尼罗罗非鱼; 氨氮; 拥挤; 生长; 抗氧化酶; 响应曲面

中图分类号: S 962.3

文献标志码: A

在硬骨鱼的机体代谢中, 氨是氮代谢的主要终产物。大部分硬骨鱼对氨的毒性较为敏感^[1]。水中的氨以离子形式(NH_4^+)和非离子形式(NH_3)存在, 一般情况下, 两种形式处于一种平衡状态, 氨的毒性主要归因于非离子氨的存在^[2]。 NH_3 是非极性的, 易溶于脂类, 其毒性是 NH_4^+ 的300~400倍^[3]。 NH_4^+ 与 NH_3 的相对比例与水环境中的温度、pH、碱度、盐度以及溶氧密切相关。通常测量水中氨的含量作为总氨氮, 总氨氮包括非离子氨态氮和 NH_4^+ -N。LEMARIÉ等^[4]研究

发现, 氨氮浓度为0.24~0.90 mg/L时, 63 d后, 鲈(*Dicentrarchus labrax*)的体质量随着浓度增加而显著下降; FOSS等^[5]报道, 将大西洋鲑(*Gadus morhua*)在不同氨氮浓度下饲养96 d, 当氨氮浓度高于0.06 mg/L时, 幼鱼的生长与摄食显著下降; PAUST等^[6]报道, 较高的氨氮浓度(0.17 mg/L)会导致大比目鱼(*Hippoglossus hippoglossus*)食欲下降、生长速度减慢和血液生化指标发生明显变化。拥挤胁迫作为一种环境胁迫因子, 通过引发鱼类的应激反应来影响其生理状况, 机体的

收稿日期: 2011-05-16 修回日期: 2011-09-16

资助项目: 公益性行业(农业)科研专项(200903046-02); 江苏省普通高校研究生科研创新计划(CXLX11-0708); 中央公益性科研业务费专项资金(2011jbf09)

通讯作者: 徐跑, E-mail: xup@ffrc.cn

免疫防御功能也会受到相应的影响^[7]。随着罗非鱼集约化养殖技术的推广,已有研究发现,拥挤胁迫对罗非鱼的生长与饲料利用有显著影响^[8-9],而氨氮主要对罗非鱼脑单胺,肝脏 ATPase 与抗氧化酶活力^[10-11]产生影响。这些研究以单因子试验为主,往往只能建立在其它环境因素相同的条件下,因而有较大的局限性。

众所周知,各种水环境因子对生物的影响是相互联系,相互制约的关系。关于氨氮与拥挤胁迫对罗非鱼幼鱼生长与肝脏抗氧化指标之间是否存在互作效应尚未见到相关报道。本研究在已有研究的基础上,采用中心复合试验设计与响应曲面分析方法考察氨氮与拥挤胁迫对吉富罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 幼鱼特定生长率和肝脏丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)与过氧化氢酶(CAT)活力的联合影响,并对各因子的二次效应及其交互作用进行探讨。中心复合设计是国内外近年来应用比较多的一种过程优化方法,可以用非线性数学模型进行拟合,具有试验次数少,精密度高,预测性好等优点^[12];响应曲面法是一种过程优化的综合技术^[13],本研究中拟用来建立因子与响应间关系的曲面模型,并对影响生物过程的因子及其交互作用进行评价。旨在为罗非鱼集约化健康养殖提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验鱼采自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴基地自繁的第十六代“吉富”品系尼罗罗非鱼幼鱼,选择无病无伤,活力强的个体作为试验用鱼。试验前在室内水泥池[水温(28±1)℃,pH(7.4±0.2)]中暂养8d,自然光周期。暂养期间使用循环水连续充气,每天7:00、11:00和16:00各投喂膨化饲料1次(粗蛋白质为30.0%、脂肪8.0%、灰分15.75%、水分12.0%),投喂量为体质量的8.0%~12.0%。

1.2 试验设计与分组

正式试验前先进行罗非鱼幼鱼的预试验,通过单因子试验确定幼鱼可以正常存活与生长的氨氮范围。试验采用中心复合试验设计,本试验的响应值为特定生长率和肝脏SOD、CAT活力与MDA含量,因子为氨氮浓度(0.02~2.00 mg/L)和养殖密度(1~5尾/10L),分别以N和C表示,每个因子的试验水平编码分别为-a、-1、0、1、a(表1),试验采用2因素5水平,共计13个组合,试验的次序随机,中心组合重复5次,每个试验组合同时设置3组平行。具体的氨氮浓度和密度组合见下表1。

表1 氨氮浓度与养殖密度的试验设计与结果

组别 group	编码值 code value		实际值 actual value		特定生长率/ (%/d) specific growth rate	丙二醛/ (nmol/mg) malondialdehyde	超氧化物歧化酶/ [U/(mg prot)] superoxide dismutas	过氧化氢酶/ [U/(mg prot)] catalase
	N	C	N	C				
	mean ± SD							
1	0	0	1.01	3.00	6.721 ± 0.834	0.782 ± 0.062	108.72 ± 7.142	45.730 ± 4.572
2	0	0	1.01	3.00	6.552 ± 0.913	0.824 ± 0.071	104.38 ± 6.581	44.518 ± 5.106
3	0	-a	1.01	1.00	4.814 ± 0.633	0.717 ± 0.068	87.022 ± 7.022	21.131 ± 3.187
4	-1	a	0.31	4.41	4.320 ± 0.792	0.871 ± 0.095	77.141 ± 6.493	32.714 ± 5.390
5	0	0	1.01	3.00	6.835 ± 0.836	0.743 ± 0.094	96.578 ± 7.391	47.229 ± 4.927
6	-a	0	0.02	3.00	7.266 ± 0.934	0.712 ± 0.087	82.334 ± 6.933	34.265 ± 6.307
7	1	1	1.71	4.41	4.482 ± 0.677	0.981 ± 0.102	71.397 ± 7.198	18.392 ± 3.271
8	0	0	1.01	3.00	6.492 ± 0.491	0.763 ± 0.049	104.786 ± 8.343	43.586 ± 4.533
9	0	0	1.01	3.00	6.671 ± 0.750	0.813 ± 0.073	106.818 ± 7.941	44.119 ± 5.927
10	1	-1	1.71	1.59	4.125 ± 0.381	0.734 ± 0.085	90.273 ± 7.927	28.343 ± 3.835
11	-1	-1	0.31	1.59	7.692 ± 0.639	0.625 ± 0.092	77.346 ± 7.036	24.737 ± 4.116
12	a	0	2.00	3.00	3.787 ± 0.375	0.967 ± 0.106	87.417 ± 8.396	30.524 ± 3.618
13	0	a	1.01	5.00	3.472 ± 0.758	0.941 ± 0.092	76.422 ± 6.803	27.350 ± 3.406

注:(1)|a|=1.414 21 为星号臂值,中心点重复5次;(2)表中N和C分别为氨氮浓度与养殖密度,密度为尾/10L。

Notes:(1)Axial or star points |a|=1.414 21,central points were repeated five times for each experiment,(2)N and C of Table 1 represent concentrations of ammonia and density,density is individual/10 L.

1.3 试验方法

试验在 39 个 1.2 m³ 的塑料养殖桶中进行,每个塑料桶添加曝气 3 d 后的自来水 1 m³。试验前配置浓度为 1 g/L 的氯化氨母液,按照试验表的分组,配置相应的浓度梯度,每天用奈氏试剂法测定氨氮浓度,及时调整养殖水体的氨氮浓度。试验期间采用自动控温仪将温度控制在 (28 ± 0.5) °C, pH(7.6 ± 0.2)。试验采用同批孵化的鱼苗,试验开始前进行体质量和体长测量,平均体质量为 (2.972 ± 0.064) g,体长为 (4.451 ± 0.122) cm,按照表 1 的组合,1 尾/10 L、1.59 尾/10 L、3 尾/10 L、4.41 尾/10 L 和 5 尾/10 L 的实际养殖密度分别为 100 尾/m³、159 尾/m³、300 尾/m³、441 尾/m³ 和 500 尾/m³,共计 11 700 尾鱼。各组初始体质量和体长没有显著差异 (ANOVA, $P > 0.05$)。按照“1.1”进行投喂,每次过量投喂,饲喂时间持续 1 h,试验周期共计 30 d。试验期间连续充气,采用虹吸法清除桶底粪便,日换水量 1/3,保持换水前后温差不超过 ±0.5 °C。溶氧保持在 5 mg/L 以上,自然光周期。

1.4 响应指标测定

试验结束前 24 h 停饲,次日每个养殖桶随机挑选 30 尾鱼进行体长与体质量测量,特定生长率 (%/d) (SGR) = $[(\ln W_2 - \ln W_1)/(t_2 - t_1)] \times 100$ 。式中, W_1 、 W_2 为起始时间 t_1 、终末时间 t_2 时的体重 (g)。每个养殖桶再随机取 6 尾鱼,冰盘上致死取其肝脏,用滤纸吸干水分后称重,加入 4 倍体积 (W/V) 预冷生理盐水研磨,肝脏 SOD、CAT 的活性与 MDA 含量测定采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒,按照试剂盒中的说明制备粗酶液。粗酶液置于 4 °C 保存,在 24 h 内测定完毕。

1.5 数据处理

数据测定结果用平均值 ± 标准差 (mean ± SD) 表示。通过最小二乘法拟合因子与响应值之

间的二次多项回归方程为

$$\hat{Y} = b_0 + b_1 N + b_2 C + b_3 N \times C + b_4 N^2 + b_5 C^2$$

式中, \hat{Y} 为响应预测,在此响应为特定生长率、MDA 含量、SOD 和 CAT 活力; $b_0, b_1, b_2, b_3, b_4, b_5$ 分别为回归常数、氨氮与养殖密度的一次效应、氨氮与养殖密度间交互效应、氨氮与养殖密度的二次效应。

采用 STATISTICA 8.0 软件进行试验设计与结果处理,对氨氮、密度与响应值进行二次多项回归拟合。显著水平为 0.05,极显著水平为 0.01。

2 结果

2.1 氨氮与拥挤胁迫对吉富罗非鱼幼鱼特定生长率的影响

氨氮 (N) 与拥挤胁迫 (C) 对罗非鱼幼鱼特定生长率 (SGR) 的测定结果见表 1,对数据采用最小二乘法进行回归拟合,方差分析结果列于表 2。从表 2 可见,模型 $P < 0.01$,表明所建立的回归模型极显著;失拟项 $P = 0.0196 < 0.05$,这表明拟合的方程可能无效,但考虑到本试验中纯误差的均方很小 ($MS = 0.0189$),加之方程的决定系数 $R^2 = 0.9724$,校正系数 $R^2 = 0.9527$,这表明所拟合的二次方程合适。N 的一次和二次效应、C 的二次以及交互效应对 SGR 均有极显著影响 ($P < 0.01$) (表 3),C 的一次效应对 SGR 有显著影响 ($P < 0.05$);回归系数显示,氨氮的效应较拥挤胁迫明显。C 和 N 与 SGR 之间的实际二次回归方程 (1):

$$SGR = 6.0143 + 2.1382C - 2.3169N + 0.9420C \times N - 0.5872C^2 - 0.9885N^2$$

该方程的决定系数 $R^2 = 0.9724$,说明该模型能解释 97.24% 的响应值变化,仅有总变异的 2.76% 不能用此模型解释,该模型拟合程度良好。

表 2 氨氮和拥挤胁迫对幼鱼特定生长率的回归模型方差分析

Tab. 2 Analysis of variance for the effects of ammonia and crowding stress on specific growth rate of juvenile

变异源 source	平方和 sum of squares	自由度 d_f	均方 mean square	F 值 F-value	P 值 P-value
模型 model	25.5329	5	5.1066	49.3587	<0.0001
残差 residual	0.7242	7	0.1035		
失拟 lack of fit	0.6488	3	0.2163	11.4732	0.0196
纯误差 pure error	0.0754	4	0.0189		
总和 total	26.2571	12			

$$R^2 = 0.9724 \quad R^2 = 0.9527$$

表 3 氨氮和拥挤胁迫对幼鱼特定生长率模型的回归方程系数显著性检验
 Tab.3 Test of significance for regression coefficient of model of ammonia and crowding stress on specific growth rate of juvenile

变异来源 source of variation	回归系数 regression coefficient	标准误 standard error	置信下限 95% CI Low	置信上限 95% CI High	P 值 P-value
intercept	4.173 8	0.258 4	3.562 7	4.784 9	
C	0.719 0	0.256 4	0.112 8	1.325 2	0.026 3
N	-4.875 3	0.736 7	-6.617 4	-3.133 2	0.000 3
C × N	1.874 5	0.323 3	1.110 0	2.638 9	0.000 7
C ²	-1.174 4	0.122 0	-1.462 8	-0.886 0	<0.000 1
N ²	-1.957 2	0.492 8	-3.122 4	-0.792 0	0.005 4

注:表中回归系数为因子编码水平下的估计。

Notes: Regression coefficients in table represent estimate of coded factors.

氨氮和拥挤胁迫与 SGR 之间的响应曲面图及其等高线图见图 1(a 和 b)。通过该组动态图可评价试验因素对幼鱼生长的两两交互作用,曲面较陡说明影响显著($P < 0.05$),曲面较圆说明影响不显著($P > 0.05$);等高线的形状可反映出交互效应的强弱大小,椭圆型表示两因素交互作用显著($P < 0.05$),而圆形则与之相反。响应曲面分析表明,本

试验条件下,随着氨氮浓度升高,SGR 开始变化较为缓慢,基本在 7.15 %/d,氨氮浓度高于 0.6 mg/L 时,特定生长率显著下降;养殖密度对 SGR 的影响呈先上升后下降的变化,氨氮浓度为 1.01 mg/L 时,SGR 在养殖密度为 2.8 尾/10 L 时较高。氨氮浓度为 0.6 mg/L,养殖密度为 2.3 尾/10 L 时,SGR 为 7.38 %/d,可靠性为 0.926。

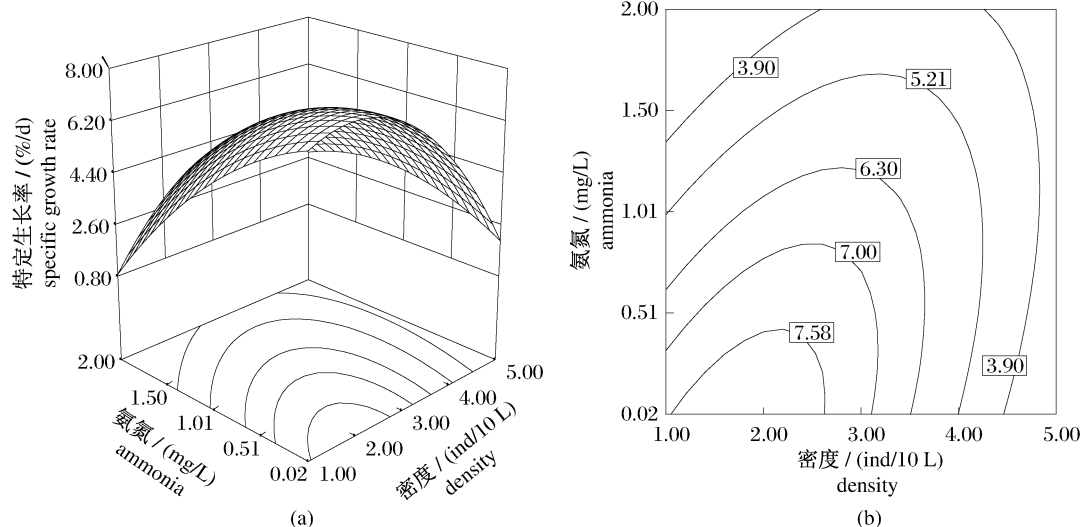


图 1 氨氮、密度及其交互作用对吉富罗非鱼幼鱼特定生长率影响的响应面 (a) 和等高线 (b)

Fig.1 Response surface plot (a) and its contour plot (b) of the effects of ammonia and density and their mutual interactions on specific growth rate of GIFT tilapia juvenile

2.2 氨氮与拥挤胁迫对吉富罗非鱼幼鱼肝脏丙二醛(MDA)含量的影响

对表 1 的 MDA 含量测定结果采用最小二乘法进行回归拟合,方差分析结果列于表 4。模型 $P < 0.01$,表明所建立的回归模型极显著;失拟项 $P = 0.215 3 > 0.05$,表明拟合的模型有效。C 和 N 的一次效应对 MDA 含量有显著影响($P < 0.05$),C 和 N 的二次效应与互作对 MDA 含量无

显著影响($P > 0.05$) (表 5);回归系数显示,氨氮的效应较拥挤胁迫明显。C、N 与 MDA 含量之间的实际二次回归方程(2):

$$MDA = 0.562 3 + 0.030 9C + 0.024 1N + 0.000 1C \times N + 0.007 0C^2 + 0.038 8N^2$$

该方程的决定系数 $R^2 = 0.913 2$,说明该模型能解释 91.32% 响应值的变化,仅有总变异的 8.68% 不能用此模型解释,该模型拟合程度良好。

表 4 氨氮和拥挤胁迫对幼鱼肝脏 MDA 含量的回归模型方差分析

Tab. 4 Analysis of variance for the effects of ammonia and crowding stress on content of MDA of juvenile

变异源 source	平方和 sum of squares	自由度 d_f	均方 mean square	F 值 F-value	P 值 P-value
模型 model	0.129 7	5	0.025 9	14.732 9	0.001 3
残差 residual	0.012 3	7	0.001 8		
失拟 lack of fit	0.007 8	3	0.002 6	2.334 9	0.215 3
纯误差 pure error	0.004 5	4	0.001 1		
总和 total	0.142 0	12			

$$R^2 = 0.913 2 \quad R^2 = 0.851 2$$

表 5 氨氮和拥挤胁迫对幼鱼肝脏 MDA 含量模型的回归方程系数显著性检验

Tab. 5 Test of significance for regression coefficient of model of ammonia and crowding stress on content of MDA of juvenile

变异来源 source of variation	回归系数 regression coefficient	标准误 standard error	置信下限 95% CI Low	置信上限 95% CI High	P 值 P-value
intercept	0.923 2	0.033 7	0.843 5	1.002 9	
C	0.103 2	0.033 4	0.024 1	0.182 2	0.017 7
N	0.253 2	0.096 1	0.026 0	0.480 5	0.033 7
C × N	0.000 1	0.042 2	-0.099 7	0.099 7	1.000 0
C ²	0.014 0	0.015 9	-0.023 6	0.051 6	0.408 0
N ²	0.076 8	0.064 3	-0.075 2	0.228 8	0.271 2

注:表中回归系数为因子编码水平下的估计。

Notes: Regression coefficient in table represent estimate of coded factors.

氨氮和拥挤胁迫与 MDA 含量的响应曲面图及其等高线图见图 2(a 和 b)。本试验条件下,随着氨氮浓度与密度的增加,MDA 含量呈上升趋势;

氨氮浓度与密度对肝脏 MDA 含量都有显著影响 ($P < 0.05$),氨氮浓度为 2 mg/L,养殖密度为 5 尾/10 L 时,幼鱼肝脏 MDA 含量为 1.10 nmol/mg。

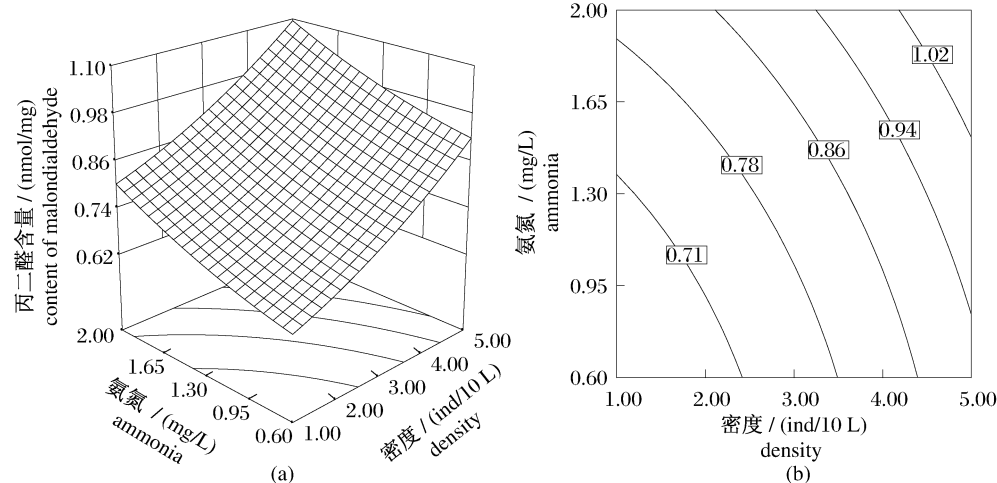


图 2 氨氮、密度及其交互作用对吉富罗非鱼幼鱼肝脏 MDA 含量影响的响应面 (a) 和等高线 (b)
Fig. 2 Response surface plot (a) and its contour plot (b) of the effects of ammonia and density and their mutual interactions on liver MDA content of GIFT tilapia juvenile

2.3 氨氮与拥挤胁迫对吉富罗非鱼幼鱼肝脏超氧化物歧化酶 (SOD) 活力的影响

对表 1 的 SOD 活力测定结果采用最小二乘

法进行回归拟合,方差分析结果列于表 6。模型 $P < 0.01$,表明所建立的回归模型极显著;失拟项 $P = 0.650 0 > 0.05$,表明拟合的模型有效。N 的

一次效应、C 和 N 的二次效应对 SOD 活力有极显著影响 ($P < 0.01$), C 的一次效应对 SOD 活力有显著影响 ($P < 0.05$), C 和 N 之间无互作效应 ($P > 0.05$) (表 7); 回归系数显示, 氨氮的效应较拥挤胁迫明显。C、N 与 SOD 活力之间的实际二次回归方程(3):

$$SOD = 18.5205 + 38.7470C + 61.0548N - 4.7176C \times N - 6.1656C^2 - 21.9490N^2$$

该方程的决定系数 $R^2 = 0.9389$, 说明该模型能解释 93.89% 响应值的变化, 仅有总变异的 6.11% 不能用此模型解释, 该模型拟合程度良好。

表 6 氨氮和拥挤胁迫对幼鱼肝脏 SOD 活力的回归模型方差分析

Tab. 6 Analysis of variance for the effects of ammonia and crowding stress on activities of SOD of juvenile

变异源 source	平方和 sum of squares	自由度 d_f	均方 mean square	F 值 F-value	P 值 P-value
模型 model	1 908.066 5	5	381.613 3	21.505 6	0.000 4
残差 residual	124.213 9	7	17.744 8		
失拟 lack of fit	38.399 2	3	12.799 7	0.596 6	0.650 0
纯误差 pure error	85.814 7	4	21.453 7		
总和 total	2 032.280 3	12			

$R^2 = 0.9389 \quad R^2 = 0.8952$

表 7 氨氮和拥挤胁迫对幼鱼肝脏 SOD 活力模型的回归方程系数显著性检验

Tab. 7 Test of significance for regression coefficient model of ammonia and crowding stress on activities of SOD of juvenile

变异来源 source of variation	回归系数 regression coefficient	标准误 standard error	置信下限 95% CI low	置信上限 95% CI high	P 值 P-value
intercept	84.867 7	3.384 6	76.864 4	92.871 1	
C	-10.930 4	3.357 3	-18.869 2	-2.991 7	0.013 9
N	-58.161 8	9.648 5	-80.976 9	-35.346 7	0.000 5
C × N	-9.388 1	4.233 9	-19.399 6	0.623 5	0.062 1
C ²	-12.331 2	1.597 1	-16.107 8	-8.554 6	0.000 1
N ²	-43.460 2	6.453 3	-58.719 9	-28.200 5	0.000 3

注: 表中回归系数为因子编码水平下的估计。

Notes: Regression coefficients in table represent estimate of coded factors.

氨氮和拥挤胁迫与 SOD 活力的响应曲面图及其等高线图见图 3(a 和 b)。本试验条件下, 养殖密度为 3 尾/10 L, 氨氮浓度为 0.02 ~ 1.01 mg/L 时, 随着氨氮浓度升高, SOD 活力呈上升趋势, 浓度高于 1.01 mg/L 时, SOD 活力明显下降; 氨氮浓度为 1.01 mg/L, SOD 活力在密度为 2.7 尾/10 L 时较高; 氨氮浓度为 1.10 mg/L, 养殖密度为 2.72 尾/10 L 时, 肝脏 SOD 活力为 104.78 U/(mg prot), 其可靠性为 0.895。

2.4 氨氮与拥挤胁迫对吉富罗非鱼幼鱼肝脏过氧化氢酶(CAT)活力的影响

对表 1 的 CAT 活力测定结果采用最小二乘法进行回归拟合, 方差分析结果列于表 8。模型

$P < 0.01$, 表明所建立的回归模型极显著; 失拟项 $P = 0.0911 > 0.05$, 表明拟合的模型有效。N 的一次与二次效应对 CAT 活力有极显著影响 ($P < 0.01$), C 的一次效应对 CAT 活力有显著影响 ($P < 0.05$), C 和 N 之间有互作效应 ($P < 0.01$) (表 9); 回归系数显示, 氨氮的效应较拥挤胁迫明显。C、N 与 CAT 活力之间的实际二次回归方程(4):

$$CAT = -31.2883 + 30.0666C + 39.1208N - 4.5281C \times N - 5.4816C^2 - 14.0562N^2$$

该方程的决定系数 $R^2 = 0.9692$, 说明该模型能解释 96.92% 响应值的变化, 仅有总变异的 3.08% 不能用此模型解释, 该模型拟合程度良好。

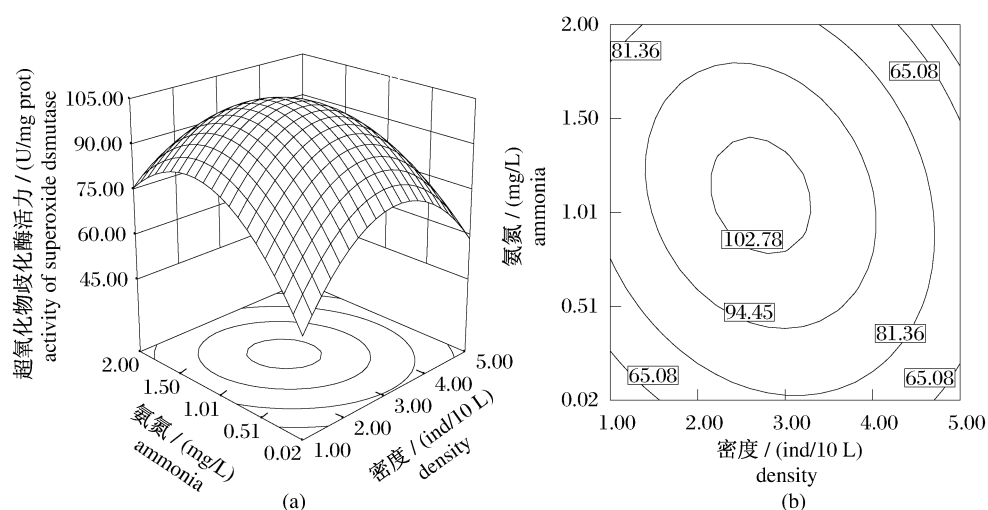


图3 氨氮、养殖密度及其交互作用对吉富罗非鱼幼鱼 SOD 活力影响的响应面 (a) 和等高线 (b)
Fig.3 Response surface plot (a) and its contour plot (b) of the effects of ammonia and density and their mutual interactions on activities of SOD of GIFT tilapia juvenile

表8 氨氮和拥挤胁迫对幼鱼肝脏 CAT 活力的回归模型方差分析

Tab.8 Analysis of variance for the effect of ammonia and crowding stress on activities of CAT of juvenile

变异源 source	平方和 sum of squares	自由度 d_f	均方 mean square	F 值 F-value	P 值 P-value
模型 model	1 165.124 0	5	233.024 8	44.083 2	<0.000 1
残差 residual	37.002 1	7	5.286 0		
失拟 lack of fit	28.496 7	3	9.498 9	4.467 2	0.091 1
纯误差 pure error	8.505 4	4	2.126 4		
总和 total	1 202.126 1	12			

$R^2 = 0.969 2$ $R^2 = 0.947 2$

表9 氨氮和拥挤胁迫对幼鱼肝脏 CAT 活力模型的回归方程系数显著性检验

Tab.9 Test of significance for regression coefficient of model of ammonia and crowding stress on activities of CAT of juvenile

变异来源 source of variation	回归系数 regression coefficient	标准误 standard error	置信下限 95% CI low	置信上限 95% CI high	P 值 P-value
Intercept	28.116 8	1.847 3	23.748 7	32.485 0	
C	-5.550 3	1.832 4	-9.883 2	-1.217 4	0.019 1
N	-43.578 3	5.266 1	-56.030 6	-31.125 9	<0.000 1
C × N	-9.010 9	2.310 8	-14.475 1	-3.546 6	0.005 9
C ²	-10.963 3	0.871 7	-13.024 5	-8.902 0	<0.000 1
N ²	-27.832 0	3.522 2	-36.160 6	-19.503 3	<0.000 1

注:表中回归系数为因子编码水平下的估计。

Notes: Regression coefficients in table represent estimate of coded factors.

氨氮和拥挤胁迫与 CAT 活力的响应曲面图及其等高线图见图 4(a 和 b)。本试验条件下,养殖密度为 3 尾/10 L,氨氮浓度为 0.02 ~ 0.90 mg/L 时,随着氨氮浓度升高,CAT 活力呈上升趋势,氨氮浓度高

于 0.9 mg/L 时,CAT 活力明显下降;养殖密度对幼鱼肝脏 CAT 活力的影响也呈先上升后下降的变化。养殖密度为 3.1 尾/10 L,氨氮浓度为 0.89 mg/L 时,CAT 活力为 45.23 U/(mg prot),其可靠性为 0.931。

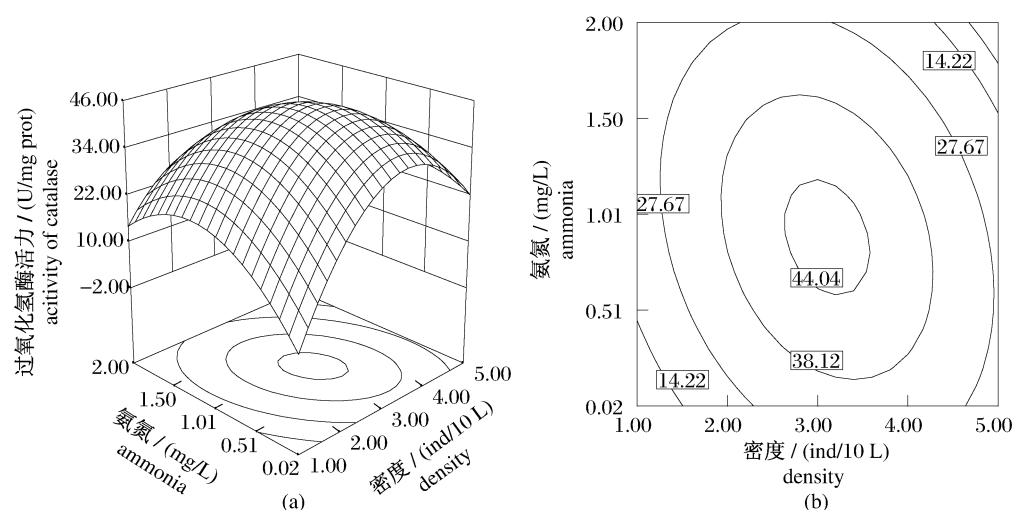


图4 氨氮、养殖密度及其交互作用对吉富罗非鱼幼鱼 CAT 活力影响的响应面 (a) 和等高线 (b)

Fig. 4 Response surface plot (a) and its contour plot (b) of the effects of ammonia and density and their mutual interactions on activities of CAT of GIFT tilapia juvenile

3 讨论

鱼类机体的生理生化变化与环境因子紧密相连^[14]。环境因子包括生物因子与非生物因子,生物因子指食物的摄取、个体的发育阶段、亲本的来源、昼夜节律的变化以及病害等;非生物因子通常指与水质有关的因子。本试验条件下,温度、pH、溶氧等环境因子变化较小,各组基本相同,这些环境条件都有利于罗非鱼幼鱼生长。因此,试验中环境因素对幼鱼生长与肝脏抗氧化指标的影响可以归因为氨氮与拥挤胁迫的效应,响应曲面分析表明,氨氮与拥挤胁迫对其生长和肝脏 MDA 含量、SOD 与 CAT 活力均有显著影响,二次多项回归模型的决定系数分别达到 0.972 4、0.913 2、0.938 9 和 0.969 2。

3.1 氨氮与拥挤胁迫对吉富罗非鱼幼鱼生长的影响

本试验中,幼鱼在不同的氨氮浓度与拥挤胁迫组合下饲养 30 d,养殖密度为 3 尾/10 L 时,氨氮浓度为 0.02 mg/L 的试验组,幼鱼的特定生长率是 2 mg/L 组的 1.92 倍。当氨氮浓度高于 0.6 mg/L 时,幼鱼的生长率显著下降。氨氮浓度较低时,罗非鱼可以利用自身的代谢调节进行适应,因而,对其生长影响较小。试验中发现,氨氮浓度低于 0.6 mg/L 时,特定生长率维持在 7.15 %/d 左右。随着水环境中氨氮浓度的提高,罗非鱼呼吸频率加快,耗氧率上升,机体的能量主要应对环

境胁迫,用于生长的将会相应减少,呈现特定生长率下降的变化。El-SHAFI 等^[15]研究发现,水环境中氨氮含量上升,会抑制鱼体的氨氮排泄,使血液和组织中氨氮的浓度升高,进而对鱼体产生一系列毒性影响,当水中非离子氨的浓度高于 0.144 mg/L 时,对尼罗罗非鱼的生长有抑制作用。这与本试验的浓度水平相差较大,可能是因为养殖密度与鱼体规格的不同。THURSTON 等^[16]研究发现,水中非离子氨含量低于 0.44 mg/L 时对黑头呆鱼 (*Pimephales promelas*) 的生长和存活没有影响,但当浓度高于 0.91 mg/L 时会对其生长和存活产生明显的负影响;HARGREAVES 等^[17]在对条纹石鱼 (*Morone saxatilis*) 的研究中也发现了类似的结论。鱼类面对氨氮胁迫时,机体利用各种反应途径来避免氨在体内积累。NASR 等^[18]报道,尼罗罗非鱼暴露在 0.33 mg/L 的非离子氨环境中会引起鱼鳃表面细胞损伤,红细胞载氧下降,肝脏器官供氧不足;BUCHER 等^[19]研究发现斑鳟 (*Salmo trutta*) 饲养在非离子氨高于 0.13 mg/L 水环境中,肝和肾脏的机能会发生改变,代谢所产生的能量主要用于抵御氨氮胁迫。

养殖密度也是罗非鱼工厂化养殖中的重要影响因素之一。由于试验用鱼的规格不同,以及环境因素的差异等原因,导致结论有所差异。OSOFERO 等^[20]研究发现,密度在 50 ~ 200 尾/

m^3 时,养殖密度对尼罗罗非鱼生长、存活与饲料转化率没有显著影响;Al-JERIAN^[21]发现,养殖密度为 150、300 和 450 尾/ m^3 时,尼罗罗非鱼的增重率随密度的升高而降低,密度为 150 尾/ m^3 时,罗非鱼拥有最佳生长速度;DAMBO 等^[22]发现均重为 10.56 mg 的尼罗罗非鱼苗种,最佳的苗种培育密度为 500 ~ 1 000 尾/ m^3 ,升高或降低密度,苗种的生长都将减慢。本试验中发现,体质量为 2.972 g 的幼鱼,养殖密度为 100 ~ 500 尾/ m^3 时,特定生长率随密度的升高呈先升高后下降的变化趋势,试验结果与 DAMBO 等^[22]的相似,试验用鱼规格都较小。罗非鱼幼鱼喜群居,集群生活在一起时,有利于摄食和活动,寻找食物的时间相对较短,而有较多的时间用于摄食^[23]。HONER 等^[23]发现高养殖密度(7.5 kg/ m^3)环境中罗非鱼幼鱼生长快于低密度(3.75 kg/ m^3)环境中的鱼。鱼类行为的相互作用减少而引起低密度中鱼的生长减慢,这是群居作用的互利性一面^[24]。然而随着密度继续升高,会导致鱼类对空间和饲料的竞争,产生了应激反应,影响养殖群体的生长率。

3.2 氨氮与拥挤胁迫对吉富罗非鱼幼鱼肝脏抗氧化指标的影响

环境与生理胁迫可能对鱼类产生氧化压力,机体反应生成大量自由基。MDA 是自由基作用于脂质过氧化物后的主要分解产物,会引起蛋白质、核酸等生命大分子的交联聚合,且具有细胞毒性。在一定范围内,生物体可以通过改变基因表达水平,进行相应蛋白质的合成,而酶主要由蛋白质组成^[25]。SOD 与 CAT 作为机体应对氧化损伤的重要的抗氧化酶,SOD 超氧化物自由基将生物自身代谢或外界胁迫下,需氧细胞在氧化还原反应中产生的一系列有毒物质转化为过氧化氢,过氧化氢本身对机体细胞也有剧毒作用,可以通过芬顿(Fenton)反应产生大量具有毒性和反应活性的羟自由基,而 CAT 作为过氧化氢的清除剂,可以将过氧化氢还原成氧分子和水^[26]。因此,SOD 与 CAT 活力的改变,对于维持氧化剂和抗氧化剂之间的平衡有重要作用。本研究中,罗非鱼肝脏 MDA 含量随氨氮浓度的上升而上升,而 CAT 与 SOD 的活力呈先上升后下降的变化。氨氮浓度为 0.9 ~ 1.1 mg/L 时,SOD 与 CAT 活力较高。可能是因为,一定的氨氮浓度下,鱼类通过增加代谢来应对环境胁迫,氧自由基的产生也随之增加,

SOD 与 CAT 活力的增加可视为生物体对新陈代谢的适应,减轻脂质过氧化损伤。当氨氮浓度超出罗非鱼自身的耐受范围时,氧化还原反应产生的氧自由基不断积累,MDA 含量也会提高^[27]。机体可能通过降低蛋白质与氨基酸的分解代谢来减少体内有毒氨的积聚^[28],当抗氧化酶难以抵御细胞内的氧化损伤时,机体的抗氧化酶活力将会降低。樊甄姣等^[29]研究发现,适当的氨氮刺激可增加胞内外活性氧的含量,增加栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)的 SOD 与 CAT 活力,但较高浓度氨氮可以明显抑制抗氧化酶活力。因此,SOD 与 CAT 受环境胁迫变化较为明显,可作为评估罗非鱼面对环境胁迫时氧化应激反应的良好生化指标。

鱼类集约化养殖中,水体中较高的氨氮浓度往往与高密度的养殖环境紧密相关。通常,由于水质量的下降,养殖密度与鱼类的摄食和生长呈负相关。同时高养殖密度迫使个体间相互攻击的机会增加,鱼类活动耗能与耗氧增加。本试验中,在养殖密度为 1 ~ 3 尾/10 L 时,机体可以通过增加 SOD 与 CAT 活力来降低氧化损伤。但是随着养殖密度胁迫的增加,幼鱼肝脏 MDA 含量明显上升,MDA 含量升高实际上是氧自由基产生过多,当体内自由基的产生超出了自身的清除能力,造成细胞损伤,机体抗氧化能力将下降^[30]。试验中发现,养殖密度高于 3 尾/10 L 时,随着 MDA 含量的上升,SOD 与 CAT 活力显著降低,由于抗氧化酶活性的下降,使机体抗氧化能力受阻,从而造成肝脏组织中的脂质过氧化物的进一步增加。

3.3 氨氮与拥挤胁迫对吉富罗非鱼幼鱼生长及肝脏抗氧化指标的联合影响

本试验采用中心复合试验设计安排氨氮与养殖密度组合,在考察单因子效应的同时,可以对氨氮与养殖密度的互作进行分析。随着水环境中氨氮浓度的变化,养殖密度对生长的影响也有所不同。响应曲面分析表明,氨氮浓度为 0.02 ~ 0.20 mg/L,养殖密度在 1 ~ 2 尾/10 L 时,幼鱼特定生长率较高;氨氮浓度高于 0.20 mg/L,养殖密度为 3 尾/10 L 左右时,生长速度较快。氨氮为 0.02 mg/L,特定生长率在密度为 1 尾/10 L 时,为 7.54 %/d;而养殖密度为 5 尾/10 L 时,仅为 2.07 %/d,氨氮与拥挤胁迫之间存在显著的互作效应(表 3)。可能是因为随着养殖密度的增加,

水质恶化加剧,溶氧降低,CO₂、氨态氮含量上升^[31]。因而,水中非离子氨的浓度也会随之变高,罗非鱼呼吸频率加快,代谢率增加,产生的能量主要用于应对环境胁迫。同时水环境中非离子氨的毒性会随溶氧不足而上升,养殖密度较低时,水中溶氧较为充足,环境胁迫对生长的影响被良好的水体环境所减弱^[32]。如果幼鱼长期生活在氨氮浓度较高的环境中,机体会进行一些适应性调节。在适当的环境胁迫下,可能会刺激一些酶活性的表达,提高摄食与代谢强度。本试验中,氨氮浓度较高时,幼鱼在3尾/10 L的情况下生长速度较快。氨氮与拥挤胁迫对肝脏MDA含量和SOD活力无明显互作,对CAT活力有互作效应。另外,氨氮效应对生长和肝脏抗氧化指标的影响较拥挤胁迫明显。氨氮与拥挤胁迫的二次效应对生长也有极显著影响,说明二因子对生长的影响存在峰值。因而,较低的氨氮胁迫对幼鱼的生长无抑制作用。同时,在实际生产中,合理的安排养殖密度可以提高罗非鱼的生长速度。

本试验采用中心复合设计,通过响应曲面法建立氨氮与拥挤胁迫对特定生长率和肝脏MDA含量、SOD与CAT活力的连续变量曲面模型,二次多项回归方程的拟合度较好,可以对生长与肝脏抗氧化指标的变化进行很好的分析与预测。在实际生产中,通过加注新水,向水体充氧等方式,可以降低非离子氨毒性,提高鱼体的抗氧化能力。同时,在罗非鱼的集约化养殖中应该合理安排好养殖密度,使罗非鱼的生长潜能得到较好的发挥。

参考文献:

- [1] RASMUSSEN R S, KORSGAARD B. The effect of external ammonia on growth and food utilization of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1996, 205(1-2): 35-48.
- [2] RUSSO R C, THURSTON R V. Toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to fishes [M] // BRUNED, TOMASSO J. Aquaculture and Water Quality. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 1991: 58-89.
- [3] HAYWOOD G P. Ammonia toxicity in teleost fish; a review [J]. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences, 1983, 1177: 1-35.
- [4] LEMARIÉ G, DOSDAT A, COVÉSA D, et al. Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles [J]. Aquaculture, 2004, 229: 479-491.
- [5] FOSS A, SIIKAVUOPIO S I, SÆTHER B S, et al. Effect of chronic ammonia exposure on growth in juvenile Atlantic cod [J]. Aquaculture, 2004, 237: 179-189.
- [6] PAUST L O, FOSS A, IMSLAND A K. Effects of chronic and periodic exposure to ammonia on growth, food conversion efficiency and blood physiology in juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) [J]. Aquaculture, 2011, 315: 400-406.
- [7] 石小涛, 李大鹏, 庄平, 等. 养殖密度对史氏鲟消化率、摄食率和生长的影响 [J]. 应用生态学报, 2006, 17(8): 1517-1520.
- [8] UDDIN M S, RAHMAN S M S, AZIM M E, et al. Effects of stocking density on production and economics of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) polyculture in periphyton-based systems [J]. Aquaculture Research, 2007, 38: 621-626.
- [9] CARRO A, NZALOTTA A E, MCGINTY A S. Effects of stocking density on growth of *Tilapia nilotica* cultured in cages in ponds [J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2007, 17(1-4): 52-57.
- [10] HEGAZI M M, HASANEIN S S. Effects of chronic exposure to ammonia concentrations on brain monoamines and ATPases of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology, 2010, 151(4): 420-425.
- [11] HEGAZI M M, ATTIA Z I, ASHOUR O A. Oxidative stress and antioxidant enzymes in liver and white muscle of Nile tilapia juveniles in chronic ammonia exposure [J]. Aquatic Toxicology, 2010, 99(2): 118-125.
- [12] 于杰, 邹梅娟, 郝秀华, 等. 中心复合设计法优化盐酸普罗帕酮缓释微丸包衣液处方 [J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 11(23): 686-709.
- [13] DENIZ B, BOYACI I H. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology [J]. Journal of Food Engineering, 2007, 78(3): 836-845.
- [14] FERRON A, LEGGETT W C. An appraisal of condition measures for marine fish larvae [J]. Advances in Marine Biology, 1994, 30: 217-303.
- [15] EI-SHAFI S A, EI-GOHARY F A, NASR F A,

- et al.* Chronic ammonia toxicity to duckweed-fed tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Aquaculture*, 2004, 232(1/4):117-127.
- [16] THURSTON R V, RUSSO R C, MEYN E L, *et al.* Chronic toxicity of ammonia to fathead minnows [J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1986, 115(2):196-207.
- [17] HARGREAVES J A, KUCUK S. Effects of diel un-ionised ammonia fluctuation on juvenile hybrid striped bass, channel catfish and blue tilapia [J]. *Aquaculture*, 2001, 195(1/2):163-181.
- [18] NASR F A, EI-SHAFI S A, ABO-HEGAB S. Suitability of treated domestic wastewater for raising *Oreochromis niloticus* [J]. *Egyptian Journal of Zoology*, 1998, 31:81-94.
- [19] BUCHER F, HOFER R. The effect of treated domestic sewage on three organs (gills, kidney, liver) of brown trout (*Salmo trutta*) [J]. *Water Research*, 1993, 27(2):255-261.
- [20] OSOFERO S A, OTUBUSIN S O, DARAMOLA J A. Effect of stocking density on tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus 1757) growth and survival in bamboo-net cages trial [J]. *Journal of Fisheries International*, 2007, 2(2):182-185.
- [21] AI-JERIAN A A. Effect of stocking density on growth of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) reared in glass cages [J]. *Pakistan Journal of Zoology*, 1996, 28:621-626.
- [22] DAMBO W B, RANA K J. Effect of stocking density on growth and survival of *Oreochromis niloticus* L. fry in the hatchery [J]. *Aquaculture Research*, 1993, 24:71-80.
- [23] HONER G, ROSENTHAL H, KRUNER G. Growth of juvenile sarotherodon galilaeus in laboratory aquaria [J]. *Journal of Aquaculture in the Tropics*, 1987, 2:59-71.
- [24] 殷名称. 鱼类生态学 [M]. 北京:中国农业出版社, 1993:38-47.
- [25] PAITAL B, CHAINY G B N. Antioxidant defenses and oxidative stress parameters in tissues of mud crab (*Scylla serrata*) with reference to changing salinity [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2010, 151(1):142-151.
- [26] 叶继丹, 韩友文, 赵吉伟, 等. 噻乙醇对鲤肝胰脏抗氧化酶系统的影响 [J]. *水产学报*, 2004, 29(6):1439-1445.
- [27] REDDY-LOPATA K, AUERSWALD L, COOK P. Ammonia toxicity and its effect on the growth of the South African abalone *Haliotis midae* Linnaeus [J]. *Aquaculture*, 2006, 261:678-687.
- [28] TAYLOR J C, MILLER J M. Physiological performance of juvenile southern flounder, *Paralichthys lethostigma* (Jordan and Gilbert, 1884), in chronic and episodic hypoxia [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2001, 258(2):195-214.
- [29] 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.
- [30] 王文博, 李爱华. 环境胁迫对鱼类免疫系统影响的研究概况 [J]. *水产学报*, 2002, 26(4):368-374.
- [31] BARTONBA A, IWAMAG K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids [J]. *Annual Review of Fish Diseases*, 1991, 10(1):3-26.
- [32] FOSS A, IMSLAND A K, ROTH B, *et al.* Interactive effects of oxygen saturation and ammonia on growth and blood physiology in juvenile turbot [J]. *Aquaculture*, 2007, 271:244-251.

The combined effects of external ammonia and crowding stress on growth and biochemical activities in liver of (GIFT) Nile tilapia juvenile (*Oreochromis niloticus*)

QIANG Jun¹, XU Pao^{1,2*}, HE Jie², WANG Hui³, LI Rui-wei⁴

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resource Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center of Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

3. College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China;

4. Maonan Sango Tilapia Breeding Base, Maoming 525024, China)

Abstract: Response surface methodology (RSM) and Central Composite Rotatable Design (CCD) were used to study the combined effects of ammonia (0.02–2.00 mg/L) and density (1–5 ind/10 L) on the specific growth rate (SGR) and antioxidant activities in the liver of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*). The objectives were to find out the linear, quadratic or reciprocal effects of ammonia and density on the growth and antioxidant activities in the liver of juvenile tilapia by the regression equation. The results showed that the linear and quadratic effects of ammonia and density on the SGR were significant ($P < 0.05$), SGR increased at the beginning and then decreased with the increased concentrations of the ammonia, and the density effects showed the same trend. There was a significant interactive effect between ammonia and density on growth ($P < 0.05$). Higher SGR was observed when the density was 1–2 ind/10 L and ammonia was 0.02–0.20 mg/L. When concentrations of external ammonia were higher than 0.2 mg/L and density were around 3 ind/10 L, SGR was also higher. With the increased concentrations of ammonia and density, the content of MDA in the liver increased gradually, while the activities of SOD and CAT increased at the beginning and then decreased. The linear effect of ammonia and density had significant effects on MDA, SOD and CAT ($P < 0.05$), the quadratic effects of ammonia and density had very significant effects on the SOD and CAT ($P < 0.01$). There was a significant interactive effect between ammonia and density on CAT activity. High concentrations of external ammonia and high density inhibited SOD and CAT activities. Model equations of the effects of ammonia and density on SGR, MDA, SOD and CAT were established, with the R^2 being 0.972 4, 0.913 2, 0.938 9 and 0.969 2 respectively ($P < 0.01$), which could be used for prediction. Growth and activities of antioxidant enzymes were more influenced by ammonia than by density. In the cultural practice, it is suggested that the density should be controlled reasonably and the dissolved oxygen be maintained adequate to reduce ammonia in order to improve growth and disease resistance of tilapia.

Key words: *Oreochromis niloticus*; ammonia; crowding; growth; antioxidant enzymes; response surface

Corresponding author: XU Pao. E-mail: xup@ffrc.cn