

文章编号: 1000-0615(2016)05-0740-11

DOI: 10.11964/jfc.20150810032

## 饲料溶菌酶添加水平对氨氮应激下吉富罗非鱼血清生化指标、抗菌性能和肝脏抗氧化能力的影响

王 坛<sup>1</sup>, 华雪铭<sup>1\*</sup>, 朱伟星<sup>1,2</sup>, 吴 钊<sup>1</sup>,  
孔 纯<sup>1</sup>, 何亚丁<sup>1</sup>, 苏美英<sup>3</sup>

(1. 农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海海洋大学, 上海 201306;

2. 白银赛诺生物科技有限公司, 上海 200122; 3. 烟台南山学院工学院, 山东烟台 265713)

**摘要:** 为研究氨氮应激下溶菌酶对吉富罗非鱼血清生化指标、抗菌性能及肝脏抗氧化能力的影响, 用6种不同溶菌酶添加水平(0、18、36、54、72和90 mg/kg)的饲料(分别记为L0、L18、L36、L54、L72和L90)饲喂初始均重为(11.35±0.08) g的罗非鱼60 d, 之后应用氯化铵进行24 h氨氮应激实验。结果显示: ①应激后, 各组鱼的血清生化指标在组间存在较大差异( $P<0.05$ ), 不同溶菌酶添加水平下的鱼体对氨氮应激产生了不同的响应机制。L54组鱼主要通过激发免疫系统并调节蛋白质代谢来抵抗氨氮浓度突变; L72和L90组鱼主要通过调节高密度脂蛋白和低密度脂蛋白、胆固醇和甘油三酯之间的动态变化来缓解氨氮对机体的应激。②血清抗菌实验表明, L54和L72组鱼对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和嗜水气单胞菌的抑制能力最大, 且显著高于对照组( $P<0.05$ ); L36~L90组对溶藻弧菌的抑制作用显著高于对照组和L18组( $P<0.05$ ); 各溶菌酶添加组的鱼对枯草芽孢杆菌具有不同程度的保护作用。③应激后肝脏的超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶和过氧化氢酶活性随溶菌酶添加水平的增加总体呈现先升后降的变化趋势, L54组显著高于对照组( $P<0.05$ ); 各添加组丙二醛含量均显著低于对照组( $P<0.05$ )。研究表明, 54和72 mg/kg溶菌酶添加水平对氨氮应激下吉富罗非鱼的血清生化指标、抗菌活性和肝脏抗氧化指标产生了最积极有效的调控, 能够增强鱼体的抗应激能力。

**关键词:** 吉富罗非鱼; 溶菌酶; 氨氮应激; 血清生化指标; 肝脏抗氧化酶; 抗菌活性

**中图分类号:** S 963.73

**文献标志码:** A

吉富罗非鱼(GIFT, *Oreochromis niloticus*)隶属于硬骨鱼纲, 鲈形目(Perciformes), 丽鱼科(Cichlidae), 罗非鱼属(*Tilapia*), 在我国南方有广泛的养殖。该鱼摄食量大, 代谢旺盛, 在高密度集约化养殖模式下, 大量残饵和代谢废物聚集于水体, 加剧了各种病原菌的潜在威胁性, 严重影响鱼体健康。氨作为鱼体氮代谢的终产物, 多数鱼类对其有较强的敏感性<sup>[1]</sup>。水体中高浓度的氨氮可以通过改变鱼体的血液生化、酶

活性以及细胞膜的通透性而影响鱼类的摄食、生长和基础代谢<sup>[2-5]</sup>。当鱼体受到氨氮连续刺激且超过自身的调节阈值时, 机体的抗氧化系统遭到破坏, 部分抗氧化物质含量和酶活性下降的同时也伴有不同程度的免疫防御系统受损、外源病原菌易感性增强等现象<sup>[6-8]</sup>。研究表明, 一些饲料添加剂具有从整体上增强鱼类免疫力, 提高鱼体抗应激能力的作用。如抗菌肽的相关功能已在罗非鱼<sup>[9]</sup>、湘云鲫(*Carassius auratus*

收稿日期: 2015-08-13 修回日期: 2015-12-03

资助项目: 广东省教育部产学研结合项目(2012B091100372); 现代农业产业技术体系专项(CARS-49-04B); 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心(ZF1206)

通信作者: 华雪铭, E-mail: xmhua@shou.edu.cn

tripI)<sup>[10]</sup>、锦鲤(*Cyprinus carpio koi*)<sup>[11]</sup>等鱼类中得到证实。吴春玉等<sup>[12]</sup>和Jeney等<sup>[13]</sup>发现在饲料中添加葡聚糖可分别提高花鲈(*Lateolabrax japonicus*)和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的抗氨氮应激能力, 对降低运输应激也起到了一定的作用; 牛磺酸<sup>[14]</sup>、肌醇<sup>[15]</sup>等添加剂在鱼类抗氨氮和其他应激损伤方面的作用也日渐凸显。由此看出, 对于能提高鱼类抗应激能力的饲料添加剂的研发已越来越受到营养饲料界的关注。

溶菌酶是一类具有天然抗菌活性的蛋白多肽类物质, 广泛分布于动植物组织和分泌物中, 其主要通过破坏细菌细胞壁肽聚糖层中N-乙酰基葡萄糖胺和N-乙酰胞壁酸之间的 $\beta$ -1, 4糖苷键而使菌体裂解死亡<sup>[16]</sup>。溶菌酶作为机体中的一类重要免疫防御因子, 参与多种免疫防御反应<sup>[17]</sup>。研究表明, 溶菌酶通过调理素作用, 能激活机体的补体系统, 增强吞噬细胞的吞噬活性, 同时, 溶菌酶水解肽聚糖后所释放的肽聚糖碎片能诱导各种抗菌蛋白的合成与分泌<sup>[18-20]</sup>。朱站英等<sup>[21]</sup>用不同溶菌酶添加水平的饲料饲喂草鱼(*Ctenopharyngodon idella*), 发现400 mg/kg添加组鱼的头肾和脾脏中自然杀伤性细胞活性显著增强, 内源性g-溶菌酶mRNA表达量有较大幅度的提高。可见, 溶菌酶作用的发挥还与机体中其他免疫因子的效应机制有关。鉴于其特殊的生物活性作用以及无毒<sup>[22]</sup>、无残留<sup>[23]</sup>、耐热性强<sup>[24]</sup>等优点, 溶菌酶已在医药临床、生物工程以及食品防腐等领域有较广泛的应用。近年来, 溶菌酶还作为饲料添加剂而逐步应用于畜禽动物生产, 在改善动物的生长性能和抗病力方面, 表现出类似抗生素的作用效果<sup>[25-26]</sup>。鱼类的生活环境和生理结构与畜禽动物有较大的差异, 加之饲料加工工艺上的特殊性可能会对溶菌酶活性造成影响, 溶菌酶在水生动物饲料中的研究较少, 且仅限于溶菌酶对鱼类生长、免疫调控和抗感染能力的影响, 其在鱼类抗氨氮应激能力和调控机制方面上还鲜有研究。

本研究选取用6种不同溶菌酶添加水平饲料饲养的吉富罗非鱼进行24 h氨氮应激实验, 比较应激后各组实验鱼的血清生化指标、抗菌活性和肝脏抗氧化酶活力, 通过综合分析各生理生化指标的响应来评价不同溶菌酶水平下吉富罗非鱼的抗氨氮应激能力, 以期溶菌酶在吉富罗非鱼集约化养殖中的应用提供理论指导。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验用鱼与饲养管理

吉富罗非鱼幼鱼平均体质量(11.35±0.08) g, 随机分为6个组, 暂养于室外水泥池中的等大尼龙网箱中。应激实验前用6种饲料(L0、L18、L36、L54、L72和L90)分别饲喂罗非鱼60 d, 其中L0(空白对照组)是以鱼粉、豆粕、花生粕、菜籽粕为主要蛋白源, 以鱼油、豆油为主要脂肪源并根据罗非鱼的营养需求(NRC,2011)配制成粗蛋白质、粗脂肪和总能水平分别为35.41%、5.77%和22.87 kJ/g的基础饲料; L18、L36、L54、L72和L90是在基础水平上分别添加18、36、54、72和90 mg/kg溶菌酶制品[上海沈李科工贸有限公司; 酶的初始活性为 $5 \times 10^3$  (U/mg)]的实验饲料。日投喂量为鱼体质量的6%~8%(前期)和3%~5%(后期), 分3次投喂(8:00、12:00和17:00)。养殖期间监控水质, 使氨氮<0.3 mg/L, 溶氧>5 mg/L。

### 1.2 氨氮应激实验

饲养60 d后, 每组选取45尾规格相近的鱼(83.74±3.02) g进行24 h氨氮应激实验, 实验前禁食24 h。每组3个重复, 每个重复15尾, 置于长方形养殖箱(体积约为80 L), 实际水体积为40 L。向水体中加入氯化铵(NH<sub>4</sub>Cl)溶液, 使总氨氮(T-AN)的表观浓度达到50 mg/L, 并调节pH为7.8。预实验结果表明, 应激24 h恰好未出现鱼的死亡, 因此选择此氨氮浓度作为本次实验的应激阈值<sup>[27-28]</sup>。应激期间水温维持在(20±1) °C, 增氧机充气, 不投饵, 以减少人为干扰, 保持安静, 防止额外应激。

### 1.3 样品采集与处理

氨氮应激24 h后进行样本采集。将鱼迅速捞起后用150 mg/L的丁香酚水溶液快速将其麻醉, 用肝素化的无菌注射器尾静脉取血, 之后取出肝脏组织于液氮中。血样静置4 h后, 4000 r/min离心10 min制备血清, 分装后-20 °C冻存备用; 肝脏组织保存于-80 °C冰箱待测。

### 1.4 测定指标与方法

血清生化指标 应激后血清除溶菌酶外的各生化指标均通过迈瑞BS-200全自动生化分析仪测定, 测定指标包括总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、

碱性磷酸酶(ALP)、血糖(GLU)以及总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)。其中,ALT和AST均采用IFCC法,酶活力定义:单位待测样本与基质在37 °C下反应,340 nm下NADH吸光度的下降速率( $\Delta A/\text{min}$ )乘以常数(F),即为1个酶活性单位(U/L);ALP采用AMP缓冲液法,酶活力定义:单位待测样本与基质在37 °C下反应,1 min内催化生成硝苯酚的量,即405 nm下吸光度上升速度( $\Delta A/\text{min}$ )乘以常数(F\*)定义为1个酶活性单位(U/L)。

溶菌酶(LZM)活性采用冰浴终止法测定,利用酶与底物(溶壁微球菌粉,南京建成生物工程研究所)反应前后浊度的变化定义溶菌酶的活力大小。计算公式为溶菌酶活性 $A=[(T_{\text{样品}} - T_{\text{样品0}})/(T_{\text{标准}} - T_{\text{标准0}})] \times \text{标准管酶活力}$ (溶菌酶标准品,南京建成生物工程研究所)。酶活力单位的定义:室温25 °C、pH=6.2时,波长450 nm处,每分钟引起吸光度下降0.001为1个酶活力单位(U/mL)。

**血清抗菌活性** 选择金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)以及溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)进行抗菌实验。

首先挑取1~2 mm新鲜单一菌落接种在5 mL液体培养基中:金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为LB培养基;枯草芽孢杆菌为营养琼脂培养基(NA);嗜水气单胞菌和溶藻弧菌为胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA),后者含有1%的海盐<sup>[29]</sup>。各菌液在200~250 r/min转速的摇床中培养16 h(30 °C),然后调整菌悬液的浓度值为 $OD_{600\text{nm}}=0.5$ <sup>[30]</sup>。

血清抗菌活性的测定参考Sunyer等<sup>[31]</sup>的方法并略有改动。取100  $\mu\text{L}$ 细菌稀释液(1/10)于96微孔板中,随即加入相等体积的血清样本,与此同时,设置阴性(只加入血清)、阳性(只加入细菌稀释液)和空白(消除微孔间的误差)对照,在30 °C条件下孵育24 h,每小时记录一次吸光度值( $OD_{650}$ ),以达到稳定期的菌悬液OD值作为计算抗菌活性的数据进行统计。

抗菌活性/%= $[1-(OD_{\text{测定孔}}-OD_{\text{阴性对照}})/(OD_{\text{阳性对照}}-OD_{\text{空白孔}})] \times 100$

**肝脏抗氧化指标** 将保存于-80 °C的肝脏组织样品在冰上解冻,取适宜大小的组织块用0.86%的生理盐水漂洗,滤干水分后按1:9(m:v)的比例加

入生理盐水,在玻璃匀浆机上匀浆。匀浆液在4 °C,4000 r/min下离心10 min,上清液经稀释后用于肝脏抗氧化酶活力的测定。

肝脏总超氧化物歧化酶(T-SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性及丙二醛(MDA)含量均采用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒进行测定。

肝脏组织样本上清液中总蛋白含量的检测采用考马斯亮蓝法,使用南京建成生物工程研究所提供的蛋白定量测试盒进行测定。

## 1.5 数据统计分析

采用SPSS17.0分析软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),若存在显著性差异,再作Duncan氏法多重比较, $P<0.05$ 表示差异显著。结果均以平均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 氨氮应激后各组鱼血清生化指标的变化

经过24 h氨氮应激,除谷丙转氨酶以外的血清生化指标均表现出了一定的组间差异性(表1)。总蛋白(TP)与甘油三酯(TG)含量、碱性磷酸酶(ALP)、谷草转氨酶(AST)与溶菌酶(LZM)活性均随溶菌酶添加水平的提高呈现先升后降的变化趋势,最大值分别出现在L54或L72组,显著高于对照组和其余添加组( $P<0.05$ );而白蛋白(ALB)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)含量随溶菌酶添加水平的提高呈现出相反的变化趋势(L18组除外),L54或L72组鱼的含量最低且显著低于对照组( $P<0.05$ );低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)含量仅有L72组显著低于对照组( $P<0.05$ ),其余组之间无显著性差异;总胆固醇(TC)含量随溶菌酶添加水平的提高而逐渐降低,L90组显著低于对照组( $P<0.05$ );血糖(GLU)含量在L72组显著高于对照组( $P<0.05$ ),其他组间无显著性差异( $P>0.05$ )。

### 2.2 氨氮应激后各组鱼的血清抗菌活性

经过24 h氨氮应激,各组鱼的血清对实验菌种表现出不同的抵抗能力,对金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的抑制能力最强,达60%左右,对大肠杆菌(*E. coli*)、嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)和溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)的抑制能力为21%~40%,对枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)的抑制能力最低,为10%~25%(表2)。其中,对大肠杆菌、金黄色葡

萄球菌和嗜水气单胞菌的抑制能力随溶菌酶添加水平的提高而呈现先升高后降低的变化趋势, 在L54或L72组的抗菌活性最大, 且显著高于对照组( $P<0.05$ ); 对溶藻弧菌的抑制能力随溶菌酶添加水平的提高而增强, 其中L36~L90组鱼的抗菌能力显著高于对照组和L18组( $P<0.05$ ); 对枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)的抑制能力在各溶菌酶添加组显著低于对照组( $P<0.05$ )或与对照组无显著差异, L36和L72组最低。

### 2.3 氨氮应激后各组鱼的肝脏抗氧化指标

氨氮应激后, 罗非鱼肝脏的抗氧化酶活性及

丙二醛(MDA)含量在各溶菌酶添加组之间均表现出不同程度的差异性(表3)。随溶菌酶添加水平的提高, 超氧化物歧化酶(SOD)活性呈现先升后降的变化趋势(L18组除外), L54组活性最大, 显著高于对照组( $P<0.05$ ), 其余各组与对照组无显著性差异( $P>0.05$ ); 过氧化氢酶(CAT)活性也呈现先升后降的变化趋势(L90组除外), L54组和L90组显著高于对照组( $P<0.05$ ), 其余各组与对照组无显著性差异( $P>0.05$ ); 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)在L54组有最大活性, 显著高于对照组和其他各组( $P<0.05$ )。MDA含量在各溶菌酶添加组均显著低于对照组( $P<0.05$ ), 其中L54组和L72

表 1 氨氮应激后各组鱼血清生化指标的变化

Tab. 1 Effects of ammonia nitrogen stress on serum biochemical indices in different groups

项目 items	组别 groups					
	L0	L18	L36	L54	L72	L90
总蛋白/(g/L) TP	27.08±1.44 <sup>b</sup>	28.28±0.79 <sup>b</sup>	29±1.35 <sup>b</sup>	31.97±1.65 <sup>a</sup>	24.38±1.49 <sup>c</sup>	24.6±0.36 <sup>c</sup>
白蛋白/(g/L) ALB	13.18±0.50 <sup>b</sup>	14.60±0.50 <sup>a</sup>	13.13±0.26 <sup>b</sup>	11.30±0.70 <sup>c</sup>	11.40±0.40 <sup>c</sup>	13.27±0.61 <sup>b</sup>
谷丙转氨酶/(U/L) ALT	1.0±0.26	0.92±0.19	0.88±0.13	1.05±0.40	1.14±0.39	0.8±0.16
谷草转氨酶/(U/L) AST	4.00±0.67 <sup>c</sup>	13.33±2.08 <sup>b</sup>	11.33±3.29 <sup>b</sup>	14.56±3.02 <sup>b</sup>	21.4±6.07 <sup>a</sup>	8.92±1.84 <sup>bc</sup>
血糖/(mmol/L) GLU	5.04±0.49 <sup>b</sup>	6.98±0.68 <sup>b</sup>	5.49±0.36 <sup>b</sup>	5.73±0.42 <sup>b</sup>	9.45±2.93 <sup>a</sup>	5.43±0.60 <sup>b</sup>
高密度脂蛋白胆固醇/(mmol/L)HDL-C	2.67±0.21 <sup>a</sup>	2.11±0.17 <sup>b</sup>	2.09±0.27 <sup>b</sup>	1.73±0.13 <sup>c</sup>	1.95±0.08 <sup>bc</sup>	1.96±0.10 <sup>bc</sup>
低密度脂蛋白胆固醇/(mmol/L)LDL-C	0.36±0.06 <sup>ab</sup>	0.30±0.02 <sup>bc</sup>	0.42±0.04 <sup>a</sup>	0.37±0.05 <sup>ab</sup>	0.28±0.04 <sup>c</sup>	0.35±0.05 <sup>b</sup>
甘油三酯/(mmol/L) TG	2.89±0.16 <sup>c</sup>	3.29±0.24 <sup>bc</sup>	3.43±0.16 <sup>bc</sup>	4.23±0.51 <sup>a</sup>	3.50±0.39 <sup>b</sup>	3.09±0.41 <sup>bc</sup>
总胆固醇/(mmol/L) TC	0.97±0.08 <sup>a</sup>	0.84±0.09 <sup>ab</sup>	0.89±0.09 <sup>ab</sup>	0.83±0.09 <sup>ab</sup>	0.78±0.06 <sup>ab</sup>	0.68±0.03 <sup>b</sup>
碱性磷酸酶/(U/L) ALP	3.55±0.39 <sup>c</sup>	4.38±0.36 <sup>bc</sup>	4.87±0.40 <sup>b</sup>	6.8±0.30 <sup>a</sup>	4.12±0.86 <sup>bc</sup>	4.5±0.28 <sup>b</sup>
溶菌酶/(U/mL) LZM	361.87±10.65 <sup>b</sup>	392.09±9.16 <sup>b</sup>	382.25±34.33 <sup>b</sup>	447.72±36.07 <sup>a</sup>	395.68±20.40 <sup>b</sup>	370.26±21.98 <sup>b</sup>

注: 同行数据上标小写字母相同或无字母表示组间差异不显著( $P>0.05$ ), 无相同小写字母表示组间差异显著( $P<0.05$ )。下同  
Notes: In the same row, values with the same or no letter superscripts mean no significant difference ( $P>0.05$ ), while values with no same small letter superscripts mean significant difference ( $P<0.05$ ). The same below

表 2 氨氮应激后各组鱼的血清抗菌活性

Tab. 2 Effects of ammonia nitrogen stress on serum antimicrobial activity in different groups

项目 items	组别 groups					
	L0	L18	L36	L54	L72	L90
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	22.96±2.13 <sup>c</sup>	22.62±1.66 <sup>c</sup>	29.40±3.44 <sup>b</sup>	30.41±3.97 <sup>ab</sup>	34.05±1.19 <sup>a</sup>	27.33±2.51 <sup>b</sup>
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	52.82±4.68 <sup>c</sup>	58.78±5.94 <sup>b</sup>	63.72±4.01 <sup>ab</sup>	64.49±1.91 <sup>a</sup>	65.31±2.36 <sup>a</sup>	60.54±4.31 <sup>ab</sup>
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	24.93±5.47 <sup>a</sup>	23.39±3.74 <sup>a</sup>	10.45±4.66 <sup>c</sup>	20.45±0.79 <sup>ab</sup>	15.52±3.06 <sup>cb</sup>	19.76±4.94 <sup>ab</sup>
嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	21.18±1.93 <sup>c</sup>	24.68±1.82 <sup>bc</sup>	24.49±2.98 <sup>bc</sup>	29.32±0.49 <sup>a</sup>	27.33±3.09 <sup>a</sup>	21.87±2.52 <sup>c</sup>
溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	28.70±3.49 <sup>c</sup>	26.59±3.09 <sup>c</sup>	33.87±2.41 <sup>b</sup>	36.34±1.76 <sup>ab</sup>	37.76±2.36 <sup>ab</sup>	39.56±0.68 <sup>a</sup>

表3 氨氮应激后各组鱼肝脏抗氧化指标的变比

Tab. 3 Effects of ammonia nitrogen stress on liver antioxidant capacity in different groups

项目 items	组别 groups					
	L0	L18	L36	L54	L72	L90
超氧化物歧化酶/(U/mg prot) SOD	62.51±7.88 <sup>b</sup>	47.90±4.80 <sup>c</sup>	67.23±1.39 <sup>ab</sup>	76.80±8.37 <sup>a</sup>	72.33±5.81 <sup>ab</sup>	69.05±8.53 <sup>ab</sup>
过氧化氢酶/(U/mg prot) CAT	19.47±5.72 <sup>c</sup>	24.50±3.25 <sup>bc</sup>	25.90±2.83 <sup>bc</sup>	38.83±6.69 <sup>a</sup>	27.58±5.51 <sup>bc</sup>	31.69±5.38 <sup>ab</sup>
谷胱甘肽过氧化物酶/(U/mg prot) GSH-Px	6.45±1.51 <sup>b</sup>	5.47±1.28 <sup>b</sup>	5.09±1.70 <sup>b</sup>	11.96±2.09 <sup>a</sup>	7.23±1.34 <sup>b</sup>	7.44±1.79 <sup>b</sup>
丙二醛/(nmol/mg prot) MDA	1.05±0.07 <sup>a</sup>	0.83±0.04 <sup>bc</sup>	0.90±0.01 <sup>b</sup>	0.80±0.07 <sup>c</sup>	0.75±0.06 <sup>c</sup>	0.92±0.05 <sup>b</sup>

组含量最低。

### 3 讨论

#### 3.1 饲喂不同水平溶菌酶的吉富罗非鱼血清生化指标对氨氮应激的响应

鱼类血清生化常被用来评价鱼体的营养和健康状况以及对外界环境的适应能力,各指标之间的动态变化能从不同方面反映机体受到外源胁迫后的联合响应及回馈情况<sup>[32-34]</sup>。血清总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)与球蛋白(IgM)是反映鱼体营养、代谢、渗透调节以及免疫机能的重要指标<sup>[35]</sup>。本实验表明,氨氮应激后,随溶菌酶添加水平的提高,血清TP含量呈现先升后降的变化趋势,而ALB呈现相反的变化趋势(L18组除外),这些变化在54 mg/kg添加组具有最明显的体现,这可能与不同饲料引起的蛋白质积累和肝功能变化有关。前期研究结果表明,54 mg/kg添加组鱼的生长和营养利用情况明显优于其他添加组,鱼体蛋白类物质丰富,当面对外源氨氮胁迫时,可以集中更多的能量用于抵抗环境胁迫;此外,在减少蛋白质水解和氨基酸代谢的过程中,使得该组鱼能有效阻止氨氮在体内的积累,降低其毒性效应<sup>[36-37]</sup>。相较于54 mg/kg添加组,72和90 mg/kg添加组鱼血清TP含量显著低于对照组,ALB含量低于或与对照组无显著性差异( $P<0.05$ ),预示着饲料中较高的溶菌酶添加量存在致肝脏受损的风险,肝功能的下降一方面导致白蛋白等功能蛋白质合成下降;另一方面也将导致机体内更多的能量用于应对内外环境的双重胁迫。碱性磷酸酶(ALP)可以通过改变病原的表面结构增强机体的异己性,并由此加速吞噬细胞对异物的吞噬和降解速度<sup>[38]</sup>。应激后,血清ALP活性随溶菌酶添加水平的提高呈现先升后降的变化趋势,36、

54和90 mg/kg组显著高于对照组( $P<0.05$ ),说明含溶菌酶制品的饲料对罗非鱼在应激环境中的ALP免疫相关通路产生了积极的调控作用,尤其在54 mg/kg添加水平下,除ALP外,血清LZM活性显著高于对照组和其他添加组( $P<0.05$ ),且应激后相较于应激前有明显提高,同时从血清TP和ALB的变化趋势上也不难推测出该组鱼的IgM含量可能高于其他组,说明该组鱼在面临氨氮胁迫时能快速启动免疫系统应对应激,这可能与该组鱼前期的营养积累、免疫水平较高等因素有关。谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)主要参与氨基酸和酮酸之间的转换来调控机体的蛋白质代谢,是肝细胞受损最灵敏的指标<sup>[39]</sup>。应激后,除L90组外,其余各添加组的AST活性均显著高于对照组( $P<0.05$ ),这可能预示着溶菌酶添加组鱼的肝脏组织在非正常情况下能高效地通过降低蛋白质合成代谢而将酮酸用于其他高能量物质的合成上,以此来抵御外界的不良环境。至于肝脏是否受到损伤,还需结合组织学等结果进行判断。血糖(GLU)主要来源于食物中消化吸收的葡萄糖以及肝糖原的分解和异生作用,是机体抗应激的重要指标之一<sup>[40]</sup>。应激后,72 mg/kg添加组鱼的GLU含量显著高于其余各组( $P<0.05$ ),说明此添加水平下的鱼能通过加速肝糖原分解来满足机体在非正常情况下对能量的需要。石桂城等<sup>[41]</sup>和强俊等<sup>[42]</sup>在对罗非鱼的低温应激实验中也得到了相似的结论。

高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)是反映机体脂质代谢的重要指标,与甘油三酯和胆固醇的转运密切相关。氨氮应激后,LDL-C和TC含量均呈现降低趋势,分别在72和90 mg/kg添加组显著低于对照组( $P<0.05$ ),说明在此添加水平下,鱼体主要通过加速胆固醇分解来满

足能量需要。乌贼(*Sepiella maindroni*)<sup>[43]</sup>, 红螯光壳螯虾(*Cherax quadricarinatus*)<sup>[44]</sup>等水生动物应对氨氮胁迫也有类似的反应。然而, HDL-C含量随溶菌酶添加水平的提高呈现下降趋势, 且血清TG含量在54和72 mg/kg添加组显著高于对照组( $P<0.05$ ), 说明饲料溶菌酶添加水平不影响罗非鱼肝脏对甘油三酯的分解能力, 但能促进其将甘油三酯作为能源物质而储存。由此可看出, 不同溶菌酶添加水平下罗非鱼对氨氮应激后的响应机制存在较大差异。54 mg/kg添加水平下, 鱼体主要通过快速启动自身的免疫系统并调节蛋白质代谢供能来抵抗氨氮突变; 72和90 mg/kg添加水平下, 鱼体则主要通过调控肝脏和其他组织间的脂质代谢和糖代谢, 使机体在氨氮应激环境中可获得足够的能量来满足自身基本的生理需要。值得一提的是, 虽然不同溶菌酶添加水平下对氨氮应激的响应机制不同, 但它们都能对能量代谢进行积极有效的调控。

### 3.2 饲料溶菌酶添加水平对氨氮应激条件下吉富罗非鱼肝脏抗氧化能力的影响

研究表明, 包括鱼类在内的大多数水生动物若长期处于高氨氮浓度环境中会对其生长、组织结构以及免疫功能造成损害。与此同时, 组织在承受因胁迫而产生的化学、生理或生物学压力时, 有氧代谢途径中的非正常氧化反应风险增大, 从而增加机体的抗氧化系统压力。肝脏作为脊椎动物的主要器官, 其内超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力的变化对维持氧化剂和抗氧化剂之间的平衡有重要作用, 因此可以作为机体应对氧化损伤的重要防御体系<sup>[45-46]</sup>。本研究表明, 经24 h氨氮应激, 肝脏SOD、GSH-Px和CAT活性随溶菌酶添加水平的升高整体呈现先升高后降低的变化趋势, 而丙二醛(MDA)含量在各溶菌酶添加组均显著低于对照组, 说明添加溶菌酶可以激活罗非鱼的肝脏抗氧化系统, 并通过调节抗氧化酶的活性变化来缓解由氨氮应激引起的抗氧化压力, 而这可能与抗氧化酶系参与氨氮解毒密切相关<sup>[47]</sup>。Olsvik等<sup>[48]</sup>和Pérez-Casanova等<sup>[49]</sup>在大西洋鳕(*Gadus morhua*)上的研究发现, 当鱼体处于应激状态时, 其肝脏抗氧化体系中的相关酶就会发生变化, 通常表现为基因的上调或活性增加, 从而保护肝脏免受氧化应激损伤。

### 3.3 饲料溶菌酶添加水平对氨氮应激条件下吉富罗非鱼血清抗菌性能的影响

应激可能造成鱼类对病原菌的易感性增强, 而血清是抵抗外来病原菌入侵的一道重要屏障, 因此血清抗菌性能在一定程度上反映鱼体对病原菌的抗感染能力。另有研究指出, 应激条件会激发鱼类免疫应答系统, 尤指其体液免疫, 因此可能对病原菌产生更大的抗性<sup>[50]</sup>。罗非鱼摄食含溶菌酶的饲料60 d, 氨氮应激后血清对金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的抑制能力明显高于应激前(前期研究结果), 且变化趋势与应激前相似, 说明口服溶菌酶60 d所累积的抗菌能力是鱼体有效抵抗氨氮应激的基础。另外, 除溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)外, 各组鱼血清对致病菌的最大抗性均出现在54或72 mg/kg添加组, 而90 mg/kg添加组出现下降的趋势或与对照组无显著性差异, 结合血清TP、ALP和LZM等的变化情况看, 这可能与SOD、CAT、AKP等兼性免疫功能的酶类或其他免疫因子受到激发, 增强其对外来异物的抵抗能力有关<sup>[51-52]</sup>。再者, 54和72 mg/kg添加组鱼肝脏的抗氧化能力要优于其他组, 这可能也是这两组鱼血清抗菌性能得以充分发挥的另一重要原因, 相似的结论已在大西洋鳕上得到证实<sup>[53]</sup>。

另有研究表明, 鱼类处于应激状态时导致的葡萄糖水平的升高也会诱导血清抗菌性能的提高<sup>[46]</sup>。从血清生化结果可看出, 54 mg/kg添加组的血糖含量明显高于对照组( $P<0.05$ ), 因而在一定程度上诱发了鱼体的血清抗菌活性, 使得该组鱼在整体水平上表现出了更大的抗菌优势。对于枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)而言, 高剂量溶菌酶添加水平下会降低机体对其的抵抗能力, 这可能与该溶菌酶制品进入机体后选择性地对有害菌加以抑制、对有益菌加以保护, 从而实现菌群结构的调节有关<sup>[54]</sup>。

## 4 小结

本实验条件下, 饲料中添加不同水平的溶菌酶使氨氮应激下的罗非鱼在血清生化、抗菌性能和肝脏抗氧化能力方面表现出了不同的回馈响应。综合以上三方面的结果, 认为54和72 mg/kg添加水平下罗非鱼能够最有效地通过调控蛋白质、脂肪和糖类代谢以及激发免疫系统和肝脏抗氧化系统来提高自我保护能力, 增强机体对氨氮应激的抵抗能力。

## 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] Lemarié G, Dosdat A, Covès D, *et al.* Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles [J]. Aquaculture, 2004, 229(1-4): 479-491.
- [3] 黄厚见, 蒋玫, 李磊, 等. 摄食水平和氨氮对鲈鱼幼鱼食物消化及生长的影响[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(4): 521-528.  
Huang H J, Jiang M, Li L, *et al.* Effects of ration level and ammonia exposure on food digestion and growth of juvenile mullet *Liza haematocheila* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2013, 8(4): 521-528 (in Chinese).
- [4] Alam M, Frankel T L. Gill ATPase activities of silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell), and golden perch, *Macquaria ambigua* (Richardson): effects of environmental salt and ammonia [J]. Aquaculture, 2006, 251(1): 118-133.
- [5] 李波, 樊启学, 杨凯, 等. 慢性氨氮胁迫对黄颡鱼摄食、生长及血液指标的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(6): 824-828.  
Li B, Fan Q X, Yang K, *et al.* Effects of chronic ammonia stress on foraging, growth and haematological parameters of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) juveniles [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2011, 17(6): 824-828 (in Chinese).
- [6] Romano N, Zeng C S. Ontogenetic changes in tolerance to acute ammonia exposure and associated gill histological alterations during early juvenile development of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus* [J]. Aquaculture, 2007, 266(1-4): 246-254.
- [7] Liu C H, Chen J C. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2004, 16(3): 321-334.
- [8] 孙舰军, 丁美丽. 氨氮对中国对虾抗病力的影响[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(3): 267-272.  
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 (in Chinese).
- [9] 姜珊, 王宝杰, 刘梅, 等. 饲料中添加重组抗菌肽对吉富罗非鱼生长性能及免疫力的影响[J]. 中国水产科学, 2011, 18(6): 1308-1314.  
Jiang S, Wang B J, Liu M, *et al.* Effects of recombinant antimicrobial peptides on growth and immunity in tilapia (GIFT) [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(6): 1308-1314 (in Chinese).
- [10] 王自蕊, 谯仕彦, 李波, 等. 饲料中添加天蚕素抗菌肽对湘云鲫生长性能、非特异性免疫功能及抗病力的影响[J]. 动物营养学报, 2014, 26(7): 1856-1863.  
Wang Z R, Qiao S Y, Li B, *et al.* Cecropin: effects on growth performance, non-specific immunity and disease resistance of triploid crucian carp [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2014, 26(7): 1856-1863 (in Chinese).
- [11] 林鑫, 毛述宏, 杨阳, 等. 饲料中添加抗菌肽对锦鲤生长、非特异性免疫力和抗病力的影响[J]. 动物营养学报, 2013, 25(8): 1860-1865.  
Lin X, Mao S H, Yang Y, *et al.* Effects of antimicrobial peptides supplementation on growth, non-specific immunity and disease resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*) [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2013, 25(8): 1860-1865 (in Chinese).
- [12] 吴春玉, 曹俊明, 黄燕华, 等. 饲料中添加 $\beta$ -葡聚糖对花鲈生长性能、体成分、血清生化指标和抗氨氮应激能力的影响[J]. 动物营养学报, 2013, 25(12): 3033-3040.  
Wu C Y, Cao J M, Huang Y H, *et al.* Effects of dietary  $\beta$ -glucan on growth performance, body composition, serum biochemical indices and anti-ammonia-nitrogen stress ability of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*) [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2013, 25(12): 3033-3040 (in Chinese).
- [13] Jeney G, Galeotti M, Volpatti D, *et al.* Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan [J]. Aquaculture, 1997, 154(1): 1-15.
- [14] 卢玉标, 游翠红, 王树启, 等. 浅水应激后黄斑蓝子鱼生理指标变化及牛磺酸的抗应激作用[J]. 水生生物学报, 2014, 38(1): 68-74.  
Lu Y B, You C H, Wang S Q, *et al.* Physiological changes in *Siganus canaliculatus* after shallow water stress and the anti-stress effects of taurine [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(1): 68-74 (in Chinese).
- [15] 崔红红, 刘波, 戈贤平, 等. 肌醇对氨氮应激下团头鲂幼鱼免疫的影响[J]. 水产学报, 2014, 38(2): 228-236.

- Cui H H, Liu B, Ge X P, *et al.* Effects of dietary inositol on immune function of juvenile Wuchang bream under ammonia stress [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(2): 228-236 (in Chinese).
- [16] Callewaert L, Michiels C W. Lysozymes in the animal kingdom [J]. *Journal of Biosciences*, 2010, 35(1): 127-160.
- [17] Bayne C J, Gerwick L. The acute phase response and innate immunity of fish [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2001, 25(8-9): 725-743.
- [18] Nordtveit R J, Vårum K M, Smidsrød O. Degradation of fully water-soluble, partially *N*-acetylated chitosans with lysozyme [J]. *Carbohydrate Polymers*, 1994, 23(4): 253-260.
- [19] Trudel J, Potvin C, Asselin A. Expression of active hen egg white lysozyme in transgenic tobacco [J]. *Plant Science*, 1992, 87(1): 55-67.
- [20] Saurabh S, Sahoo P K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system [J]. *Aquaculture Research*, 2008, 39(3): 223-239.
- [21] 朱站英. 草鱼免疫细胞和免疫相关基因研究: 自然杀伤细胞杀伤活性和溶菌酶mRNA的表达[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.
- Zhu Z Y. Research on immune cells and immune genes of grass carp: natural killer cell activities and themRNA expression of lysozyme genes[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012 (in Chinese).
- [22] Cerven D, DeGeorge G, Bethell D. 28-Day repeated dose oral toxicity of recombinant human apo-lactoferrin or recombinant human lysozyme in rats [J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2008, 51(2): 162-167.
- [23] Bukharin O V, Valyshev A V. Microbial inhibitors of lysozyme [J]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, i Immunobiologii*, 2006 (4): 8-13.
- [24] Mañas P, Muñoz B, Sanz D, *et al.* Inactivation of lysozyme by ultrasonic waves under pressure at different temperatures [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39(6): 1177-1182.
- [25] 张世卿, 朱忠珂, 王明成, 等. 玉米—豆粕日粮添加溶菌酶对肉仔鸡生长性能、代谢及免疫指标的影响[J]. *动物营养学报*, 2008, 20(4): 463-468.
- Zhang S Q, Zhu Z K, Wang M C, *et al.* Effects of lysozyme on growth performance, metabolism and immune indices of broilers fed with corn-soybean basal diets [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2008, 20(4): 463-468 (in Chinese).
- [26] 邵春荣, 包承玉, 孙有平, 等. 溶菌酶制剂对控制仔猪腹泻的效果[J]. *江苏农业科学*, 1996, (3): 61-62.
- Shao C R, Bao C Y, Sun Y P, *et al.* Effect of lysozyme preparation on controlling diarrhea of piglets [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 1996 (3): 61-62 (in Chinese).
- [27] El-Shafai S A, El-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.
- [28] Hegazi M M, Attia Z I, Hegazi M A M, *et al.* Metabolic consequences of chronic sublethal ammonia exposure at cellular and subcellular levels in Nile tilapia brain [J]. *Aquaculture*, 2010, 299(1-4): 149-156.
- [29] Liu P C, Lin J Y, Hsiao P T, *et al.* Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from diseased cobia *Rachycentron canadum* [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2004, 44(1): 23-28.
- [30] Tille P. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*[M]. 13th ed. Edinburgh: Mosby, 2013.
- [31] Sunyer J O, Tort L. Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are effected by the alternative complement pathway [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1995, 45(3-4): 333-345.
- [32] 周玉, 郭文场, 杨振国, 等. 鱼类血液学指标研究的进展[J]. *上海水产大学学报*, 2001, 10(2): 163-165.
- Zhou Y, Guo W C, Yang Z G, *et al.* Advances in the study of haematological indices of fish [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2001, 10(2): 163-165 (in Chinese).
- [33] Bahmani M, Oryan S, Pourkazemi M, *et al.* Effects of ecophysiological stress on cellular immunity system of Persian sturgeon *Acipenser persicus*[C]. Tehran: Iranian Congress of Physiology and Pharmacology, 1999 (in Persian).
- [34] Davis K B. Temperature affects physiological stress responses to acute confinement in sunshine bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2004, 139(4): 433-440.
- [35] 徐奇友, 王常安, 许红, 等. 大豆分离蛋白替代鱼粉对哲罗鱼稚鱼生长、体成分和血液生化指标的影响[J]. *水生生物学报*, 2008, 32(6): 941-946.
- Xu Q Y, Wang C A, Xu H, *et al.* Effects of replacing fishmeal with soy protein isolated on the



- growth performance, body composition and biochemical indexes of juvenile *Hucho taimen* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, 32(6): 941-946 (in Chinese).
- [36] Ip Y K, Chew S F, Leong I A W, *et al.* The sleeper *Bostrichthys sinensis* (Family Eleotridae) stores glutamine and reduces ammonia production during aerial exposure [J]. *Journal of Comparative Physiology-Part B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 2001, 171(5): 357-367.
- [37] Wang Y X, Walsh P J. High ammonia tolerance in fishes of the family Batrachoididae (Toadfish and Midshipmen) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2000, 50(3): 205-219.
- [38] 明建华, 谢骏, 徐跑, 等. 大黄素、维生素C及其配伍对团头鲂抗拥挤胁迫的影响[J]. *水生生物学报*, 2011, 35(3): 400-413.
- Ming J H, Xie J, Xu P, *et al.* Effects of emodin, vitamin C and their combination on crowding stress resistance of Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(3): 400-413 (in Chinese).
- [39] Chen C Y, Wooster G A, Getchell R G, *et al.* Blood chemistry of healthy, nephrocalcinosis-affected and ozone-treated tilapia in a recirculation system, with application of discriminant analysis [J]. *Aquaculture*, 2003, 218(1-4): 89-102.
- [40] Mommsen T P, Vijayan M M, Moon T W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation [J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1999, 9(3): 211-268.
- [41] 石桂城, 董晓慧, 陈刚, 等. 饲料脂肪水平对吉富罗非鱼生长性能及其在低温应激下血清生化指标和肝脏脂肪酸组成的影响[J]. *动物营养学报*, 2012, 24(11): 2154-2164.
- Shi G C, Dong X H, Chen G, *et al.* Effects of dietary lipid level on growth performance of genetic improvement of farmed tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*) and its serum biochemical indices and fatty acid composition under cold stress [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2012, 24(11): 2154-2164 (in Chinese).
- [42] 强俊, 杨弘, 王辉, 等. 饲料蛋白水平对低温应激下吉富罗非鱼血清生化指标和HSP70 mRNA表达的影响[J]. *水生生物学报*, 2013, 37(3): 434-443.
- Qiang J, Yang H, Wang H, *et al.* Effects of different dietary protein levels on serum biochemical indices and expression of liver HSP70 mRNA in GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) under low temperature stress [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(3): 434-443 (in Chinese).
- [43] 尹飞, 孙鹏, 彭士明, 等. 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[J]. *生态毒理学报*, 2011, 6(3): 289-295.
- Yin F, Sun P, Peng S M, *et al.* Biochemical parameters in juvenile *Sepiella maindroni* induced by acute exposure to nitrite-N or ammonia-N [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2011, 6(3): 289-295 (in Chinese).
- [44] 蒋琦辰, 顾曙余, 张文逸, 等. 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[J]. *水产学报*, 2013, 37(7): 1066-1072.
- Jiang Q C, Gu S Y, Zhang W Y, *et al.* Acute effects of ammonia exposure on selected immunological and metabolic parameters in juvenile red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) and the post-exposure recovery [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(7): 1066-1072 (in Chinese).
- [45] 叶继丹, 韩友文, 赵吉伟, 等. 喹乙醇对鲤肝胰脏抗氧化酶系统的影响[J]. *水产学报*, 2004, 28(3): 231-235.
- Ye J D, Han Y W, Zhao J W, *et al.* Effects of dietary olaquindox on antioxidant enzymes system in hepatopancreas of *Cyprinus carpio* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2004, 28(3): 231-235 (in Chinese).
- [46] Fang Y Z, Yang S, Wu G Y. Free radicals, antioxidants, and nutrition [J]. *Nutrition*, 2002, 18(10): 872-879.
- [47] 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.
- [48] Olsvik P A, Kristensen T, Waagbø R, *et al.* Effects of hypo- and hyperoxia on transcription levels of five stress genes and the glutathione system in liver of Atlantic cod *Gadus morhua* [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2006, 209(15): 2893-2901.
- [49] Pérez-Casanova J C, Afonso L O B, Johnson S C, *et al.* The stress and metabolic responses of juvenile Atlantic cod *Gadus morhua* L. to an acute thermal challenge [J]. *Journal of Fish Biology*, 2008, 72(4): 899-916.
- [50] Ruis M A W, Bayne C J. Effects of acute stress on blood clotting and yeast killing by phagocytes of rainbow trout [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1997, 9(3): 190-

- 195.
- [51] Balasubramanian S, Prakash M, Senthilraja P, *et al.* Antimicrobial properties of skin mucus from four freshwater cultivable fishes (*Catla catla*, *Hypophthalmichthys molitrix*, *Labeo rohita* and *Ctenopharyngodon idella*) [J]. African Journal of Microbiology Research, 2012, 6(24): 5110-5120.
- [52] 张盛静, 宋晓玲, 赵小金, 等. 饲料中添加益生菌对凡纳滨对虾抗感染和5种免疫基因表达的影响[J]. 水产学报, 2015, 39(6): 899-907.
- Zhang S J, Song X L, Zhao X J, *et al.* Effects of adding probiotics to the feed on anti-infection and five kinds of immune gene expression of *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(6): 899-907 (in Chinese).
- [53] Caipang C M A, Brinchmann M F, Kiron V. Short-term overcrowding of Atlantic cod, *Gadus morhua*: effects on serum-mediated antibacterial activity and transcription of glucose transport and antioxidant defense related genes [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2008, 151(4): 560-565.
- [54] Chen Y, Zhu X, Yang Y, *et al.* Effect of dietary lysozyme on growth, immune response, intestine microbiota, intestine morphology and resistance to *Aeromonas hydrophila* in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) [J]. Aquaculture Nutrition, 2014, 20(3): 229-241.

## Effects of dietary lysozyme supplementation on serum biochemical indices, antibacterial properties and liver antioxidant capacity of GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) under ammonia-nitrogen stress

WANG Tan<sup>1</sup>, HUA Xueming<sup>1\*</sup>, ZHU Weixing<sup>1,2</sup>, WU Zhao<sup>1</sup>, KONG Chun<sup>1</sup>, HE Yading<sup>1</sup>, SU Meiyang<sup>3</sup>

(1. Key Laboratory of Genetic Resources for Freshwater Aquaculture and Fisheries, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Bai yin sino Bio-science Co., Ltd, Shanghai 200122, China; 3. College of Engineering, Yantai Nanshan University, Yantai 265713, China)

**Abstract:** This study was designed to investigate the effects of dietary lysozyme supplementation on serum biochemical indices, antibacterial properties and liver antioxidant capacity of GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) under ammonia-nitrogen stress. Juvenile tilapia with the initial weight of (11.35±0.08) g were fed with six experimental diets (labeled as L0, L18, L36, L54, L72 and L90) which were supplemented with graded lysozyme levels (0, 18, 36, 54, 72 and 90 mg/kg) in basal diet for 60 days. After that, a 24 h ammonia-nitrogen stress test with ammonia chloride was conducted to the experimental fish above. The results showed that: ① After stress, fish serum biochemical indices presented a significant difference and the fish showed different feedback responses among groups ( $P<0.05$ ). The fish in L54 group could reduce damage from ammonia-nitrogen stress through stimulating the immune system and regulating protein metabolism; while mainly through regulating the dynamic variation between high/low density lipoprotein cholesterol, cholesterol and triglyceride in L72 and L90 groups. ② Serum antibacterial test showed that there was the maximum resistance ability to *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila* in L54 and L72 groups and higher inhibiting ability to *Vibrio alginolyticus* in L36~L90 groups ( $P<0.05$ ), while lysozyme supplementation was helpful for the proliferation of *Bacillus subtilis* ( $P<0.05$ ). ③ Liver superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activity after ammonia-nitrogen stress were generally enhanced with increased dietary lysozyme level and the highest value was presented in L54 group ( $P<0.05$ ); Malonaldehyde content in each lysozyme supplemented group was significantly lower than the control group ( $P<0.05$ ). In summary, our results indicate that ingestion of a basal diet supplemented with 54 and 72 mg/kg lysozyme could produce a most positive and effective regulatory response on serum biochemical indices, antibacterial properties and liver antioxidant indices under ammonia-nitrogen stress, so as to improve fish anti-stress ability.

**Key words:** GIFT *Oreochromis niloticu*; lysozyme; ammonia-nitrogen stress; serum biochemical indices; liver antioxidant enzyme; antimicrobial activity

**Corresponding author:** HUA Xueming. E-mail: xmhua@shou.edu.cn

**Funding projects:** Ministry of Education of Guangdong Province University-industry Cooperation Project (2012B091100372); China Agriculture Research System (CARS-49-04B); Shanghai Collaborative Innovation Center for Aquatic Animal Genetics and Breeding (ZF1206)