

亚硝酸盐急性胁迫对拟穴青蟹相关免疫指标的影响*

Effects of Acute Nitrite Exposure on Immunity Indicators in *Scylla paramamosain*

赵艳飞, 宋志飞, 王贤丰, 聂振平**, 童 潼, 杨家林, 苏 琼

ZHAO Yanfei, SONG Zhifei, WANG Xianfeng, NIE Zhenping, TONG Tong, YANG Jialin, SU Qiong

(广西壮族自治区海洋研究所, 广西海洋生物技术重点实验室, 广西北海 536000)

(Guangxi Key Laboratory for Marine Biotechnology, Guangxi Institute of Oceanology, Beihai, Guangxi, 536000, China)

摘要:【目的】探讨亚硝酸盐急性胁迫对拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)机体免疫力的影响,为拟穴青蟹养殖模式调整与产业化升级提供基础资料。【方法】测定拟穴青蟹在不同浓度亚硝酸盐(0 mg/L、20 mg/L、60 mg/L、100 mg/L、140 mg/L)胁迫下其组织中碱性磷酸酶(AKP)活力、过氧化氢酶(CAT)活力、丙二醛(MDA)含量在受胁迫 48 h 内的动态变化。【结果】亚硝酸盐胁迫浓度达 60 mg/L 以上时,青蟹肝胰腺及肌肉中 AKP 活力变化显著,肌肉中 AKP 活力随时间增加呈先升高后降低趋势,各组织中 CAT 活力变化也呈先升高后降低趋势,表现出一定的“毒兴奋效应”,肝胰腺及鳃中 MDA 含量则随胁迫时间与胁迫浓度变化呈递增趋势。【结论】亚硝酸盐胁迫可通过破坏组织中非特异性免疫酶类体系运转,加剧组织中脂质过氧化方式导致机体免疫力下降。在拟穴青蟹人工养殖中,将亚硝酸盐浓度控制在 20 mg/L 以下,有助于青蟹养殖模式调整与产业化升级。

关键词:拟穴青蟹 亚硝酸盐胁迫 碱性磷酸酶 过氧化氢酶 丙二醛

中图分类号: S968.25[†]1

文献标识码: A

文章编号: 1005-9164(2017)04-0382-07

Abstract:【Objective】To investigate the effect of ambient nitrite on the immunity response, and to provide the basic data for the adjustment and industrialization of *Scylla paramamosain*, this nitrite stress experiment was designed.【Methods】In this experiment, mud crabs were divided into four nitrite exposed groups(20 mg/L, 60 mg/L, 100 mg/L and 140 mg/L ambient nitrite concentrations) and control group. Alkaline phosphatase(AKP) activity, catalase(CAT) activity and malodiadehyde(MDA) content were measured after 3 h, 6 h, 12 h, 24 h and 48 h stress.【Results】The results showed that after treated in high concentration (above 60 mg/L) nitrite exposure, AKP activity varied significantly in hepatopancreas and muscle. With the increase of time, AKP activity in muscle increased first and then decreased, which was similar with the variation tendency of CAT activity in three organizations, indicating a poison-intoxication effect. The content of MDA in hepatopancreas and gills increased with the stress time and stress concentration.【Conclusion】Therefore, nitrite stress could decrease the immunity of mud

crab by damaging enzymes system related to non-specific immunity and accelerating lipid peroxidation. In the artificial breeding of mud crabs, it would contribute to breeding pattern adjustment and industrial upgrading if the concentration of nitrite was controlled below 20 mg/L.

Key words: *Scylla paramamosain*, nitrite stress, alkaline phosphatase, catalase, malodiadehyde

收稿日期: 2017-04-11

作者简介: 赵艳飞(1988-), 男, 硕士, 主要从事海水养殖研究。

* 广西科学研究与技术开发项目(桂科合 1599005-2-18, 桂科能 1598020-10, 桂科 AB16380105, 桂科合 14125008-2-20)资助。

** 通信作者: 聂振平(1962-), 男, 工程师, 主要从事海水养殖及育苗方面的研究, E-mail: gzz_1985@sina.com。

0 引言

【研究意义】拟穴青蟹是我国主要的海水养殖种类之一,年养殖产量在我国海水甲壳类养殖中常年位居第二^[1],在其持续大规模养殖过程中,也暴露出一些问题:养殖水环境不断恶化,病害日趋严重。海水养殖业规模不断扩大,近岸海水中氮含量也逐渐升高。在人工养殖环境中,水体中无机氮主要存在形式之一是亚硝酸盐。受养殖水体中溶解氧等因素影响,其含量居高不下,甚至可达 50 mg/L 以上^[2]。水生动物长期暴露于高浓度的亚硝酸盐水体中,可导致免疫力下降,更易感染病原菌,并引起大规模疾病发生^[3-4],这也是当前青蟹养殖高发病率、高死亡率的重要原因^[5-6],严重制约了青蟹高密度工厂化养殖模式的开展与青蟹养殖产业健康升级。**【前人研究进展】**目前国内外已对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)、红螯光壳螯虾(*Cherax quadricarinatus*)等多种甲壳类^[7-9]及各种鱼类^[10-11]等开展亚硝酸盐胁迫相关研究,拟穴青蟹也已开展群体遗传多样性^[12]、性腺发育等^[13]研究,然而在亚硝酸盐胁迫相关研究中,亚硝酸盐胁迫设定浓度梯度范围仅为 0~2.37 mg/L^[6],这远不能得出高密度养殖水体中亚硝酸盐剧烈波动会对拟穴青蟹造成影响的结论。**【本研究切入点】**以亚硝酸盐为胁迫因子对拟穴青蟹进行胁迫实验,研究高浓度的亚硝酸盐胁迫对青蟹免疫及代谢的影响。**【拟解决的关键问题】**设定不同亚硝酸盐浓度梯度,并对拟穴青蟹不同组织中碱性磷酸酶(AKP)活力、过氧化氢酶(CAT)酶活力及丙二醛(MDA)含量在不同时间段的变化进行统计分析,探讨亚硝酸盐胁迫对拟穴青蟹生理生化与免疫反应的影响,以为蟹类环境胁迫研究积累资料,为拟穴青蟹养殖模式调整与产业化升级提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 材料

拟穴青蟹于 2016 年 8 月 12 日购自北海市竹林

表 1 各实验组在各时间段内取样及死亡数(只)

Table 1 The number of samples and fatalities in each experimental group in each sampling period (unit)

处理组 Groups	0~3 h		3~6 h		6~12 h		12~24 h		24~48 h	
	取样 Samples	死亡 Fatalities	取样 Samples	死亡 Fatalities	取样 Samples	死亡 Fatalities	取样 Samples	死亡 Fatalities	取样 Samples	死亡 Fatalities
C0	9	0	9	1	9	0	8	1	8	0
C20	9	0	9	0	8	3	8	0	7	1
C60	9	0	8	2	8	1	8	2	7	0
C100	9	0	8	1	8	3	6	3	6	1
C140	9	0	8	3	8	3	6	2	0	6

村养殖塘,规格:壳宽(8.12±0.57) cm,壳长(5.35±0.33) cm,体质量(117.25±13.48) g,并从中挑选附肢完整、健壮无病害的用于实验。于水泥池(2 m×2 m×1 m)中适应性驯养 2 周后开展实验,每池暂养 5~6 只,期间每日傍晚 18:00 左右投喂波纹横帘蛤(*Paphia undulata*)。驯养及实验用水为过滤后的自然海水,平均水温 29~31℃,盐度 29‰,pH 值 8.0~8.2,采用不间断充气方式,使溶解氧保持在 6~7 mg/L,日换水量约为总暂养水体的 1/3,实验开始后不再投饵、换水。

1.2 方法

1.2.1 实验设计

据报道,同一环境下同规格的拟穴青蟹对亚硝酸盐 48 h 半数致死浓度(48 h-LC₅₀)为 148.43 mg/L^[14],因此共设定 4 个亚硝酸盐浓度梯度胁迫组,即 C20 组、C60 组、C100 组、C140 组,水中亚硝酸盐表观浓度依次为 20 mg/L、60 mg/L、100 mg/L、140 mg/L。采用分析纯亚硝酸钠配制 1 g/L 母液并将各实验组调制理想值,同时另设一对照组(即 C0),不人为添加任何亚硝酸盐,每个浓度梯度有 45 只实验用蟹,各分 3 个平行,每个平行组分别于实验开始后 3 h、6 h、12 h、24 h、48 h 随机取出 2~3 只个体进行采样,每个处理组在各时间段采样数及死亡数见表 1。

1.2.2 样品制备

拟穴青蟹于-20℃麻醉 10 min 后,置于冰上解剖并取出部分肝胰腺、肌肉、鳃,其中肌肉均取自左侧游泳足相连部位,鳃取自第 2 对鳃弓。组织样品经缓冲液(pH 值 7.4,0.01 mol/L Tris-HCl,0.000 1 mol/L EDTA-2Na,0.01 mol/L 蔗糖,0.8% NaCl 溶液)冲洗并用吸水纸吸取表面水分,称重并制备 10% 匀浆液,4℃下 3 000 r/min 离心 10 min 后取上清液待测。

1.2.3 AKP、CAT 活力及 MDA 含量测定

蛋白含量、AKP 活力、CAT 活力、MDA 含量测定采用南京建成生物工程研究所的试剂盒,具体操作见试剂盒说明书。

1.3 数据处理

实验数据以平均值±标准误表示,采用 SPSS19.0 软件中 One-Way ANOVA 进行单因素方差分析,Duncan 法进行多重比较,取 $P < 0.05$ 为差异显著性水平。

2 结果与分析

由表 1 可知,亚硝酸盐急性胁迫 24 h,未足 48 h 时,C140 胁迫组青蟹均已死亡,故不再对 C140 组第 48 h 时 AKP、CAT 及 MDA 指标进行测定及分析。

2.1 亚硝酸盐胁迫对拟穴青蟹肝胰腺、肌肉和鳃中 AKP 活力的影响

在亚硝酸盐胁迫下,拟穴青蟹肝胰腺、肌肉中 AKP 活力变化显著($P < 0.05$),鳃中 AKP 活力无显著性差异($P > 0.05$)。

表 2 亚硝酸盐胁迫对拟穴青蟹肝胰腺 AKP 活力的影响

Table 2 Effects of nitrite stress on AKP activity in the hepatopancreas of *Scylla paramamosain*

处理组 Groups	AKP 活力 AKP activity				
	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h
C0	100.27±1.46 ^a	98.78±3.65 ^a	88.74±4.78 ^a	93.60±2.82 ^a	89.79±1.10 ^a
C20	111.08±2.90 ^{Aa}	82.59±0.94 ^{Cb}	93.90±1.28 ^{Ba}	82.19±2.35 ^{Cb}	82.98±3.34 ^{Cb}
C60	85.74±1.16 ^{Ab}	50.78±1.89 ^{Cc}	60.99±2.28 ^{Bb}	41.38±1.94 ^{Dd}	50.93±3.31 ^{Cc}
C100	81.18±2.07 ^{Bbc}	91.71±3.34 ^{Aa}	57.88±0.19 ^{Cb}	54.81±3.69 ^{CDe}	47.28±2.56 ^{De}
C140	75.49±5.63 ^{Ac}	53.55±2.91 ^{Cc}	61.09±3.39 ^{Bb}	33.55±2.79 ^{Dd}	---

注:不同大写字母表示同一浓度处理组不同胁迫时间差异显著($P < 0.05$),不同小写字母表示同一测试时间不同处理组间差异显著($P < 0.05$)
Note:Different capital superscripts denoted significant difference($P < 0.05$) among the same group at different test time, and the lowercase superscripts denoted significant difference($P < 0.05$) among the treatments at the same test time

表 3 亚硝酸盐胁迫对拟穴青蟹肌肉 AKP 活力的影响

Table 3 Effects of nitrite stress on AKP activity in the muscle of *Scylla paramamosain*

处理组 Groups	AKP 活力 AKP activity				
	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h
C0	6.47±0.31 ^{ab}	4.15±0.21 ^{cd}	6.70±0.48 ^a	5.19±0.20 ^a	5.69±0.20 ^a
C20	4.80±0.80 ^{bc}	9.39±0.29 ^{Aa}	5.08±0.81 ^{Bab}	5.20±0.87 ^{Ba}	3.53±0.51 ^{Bb}
C60	7.34±0.31 ^{Aa}	5.62±0.56 ^{Bbc}	3.78±0.82 ^{Cbc}	3.54±0.49 ^{Ca}	3.39±0.03 ^{Cb}
C100	5.61±0.30 ^{Abc}	3.62±0.70 ^{Bd}	1.96±0.01 ^{Ccd}	1.70±0.41 ^{Cb}	1.77±0.43 ^{Cc}
C140	6.45±0.49 ^{Ab}	5.83±0.48 ^{Ab}	1.19±0.34 ^{Bd}	1.55±0.45 ^{Bb}	---

注:不同大写字母表示同一浓度处理组不同胁迫时间差异显著($P < 0.05$),不同小写字母表示同一测试时间不同处理组间差异显著($P < 0.05$)
Note:Different capital superscripts denoted significant difference($P < 0.05$) among the same group at different test time, and the lowercase superscripts denoted significant difference($P < 0.05$) among the treatments at the same test time

2.2 亚硝酸盐胁迫对拟穴青蟹肝胰腺、肌肉和鳃中 CAT 活力的影响

从表 4 可以看出,随胁迫时间增加,除 C20 组,各处理组拟穴青蟹肝胰腺中 CAT 活力均呈现先升高后降低趋势,并在 6 h 时表现为最大值;C20 组在

亚硝酸盐胁迫条件下,拟穴青蟹肝胰腺中 AKP 活力变化见表 2。同组比较可知,各处理组在胁迫 3 h 与胁迫 6 h、12 h、24 h、48 h 时其肝胰腺中 AKP 活力均呈显著性差异($P < 0.05$),且 C20 组在胁迫 12 h 以及 C100 组在胁迫 6 h 时,其肝胰腺中 AKP 活力显著升高,随后又逐渐下降;不同组间,随亚硝酸盐胁迫浓度升高,肝胰腺中 AKP 活力整体呈下降趋势;除 C20 组外,其余各组肝胰腺中 AKP 活力均显著低于对照组($P < 0.05$),且 C60、C100、C140 组在胁迫 12 h 后 AKP 活力不再具有显著性差异($P > 0.05$)。

由表 3 可知,随胁迫时间推移,拟穴青蟹肌肉中 AKP 活力呈现显著变化($P < 0.05$),其中 C20 组在胁迫 6 h 时 AKP 活力突然升高,在之后随胁迫时间增加而降低,其余各处理组,青蟹肌肉中 AKP 活力均随时间增加而逐步下降;相同胁迫时间下,在 6 h 时,C20 组青蟹肌肉组织中 AKP 活力最大且显著高于对照组($P < 0.05$),胁迫 12 h 后,各实验组青蟹肌肉中 AKP 活力整体呈下降趋势,且表现出除 C20 组外,其余各组均显著低于对照组($P < 0.05$)。

各胁迫时间未出现显著性变化($P > 0.05$),与对照组也无显著性差异($P > 0.05$),但在胁迫 24 h 以后其肝胰腺中 CAT 活力高于其余各处理组并呈现显著性差异($P < 0.05$),在相同胁迫时间下,随胁迫浓度的升高,青蟹肝胰腺中 CAT 活力呈先升高后降

表 4 亚硝酸盐胁迫对拟穴青蟹肝胰腺 CAT 活力的影响

Table 4 Effects of nitrite stress on CAT activity in the hepatopancreas of *Scylla paramamosain*

处理组 Groups	CAT 活力 CAT activity				
	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h
C0	8.39±1.20 ^{ab}	8.27±0.73 ^b	7.57±0.33 ^b	10.56±0.70 ^a	8.38±0.36 ^b
C20	10.41±1.21 ^a	10.25±0.41 ^b	11.06±0.97 ^a	12.11±0.69 ^a	12.45±0.46 ^a
C60	10.28±0.21 ^{Ba}	17.09±0.68 ^{Aa}	7.86±1.54 ^{BCb}	6.52±0.57 ^{Cb}	6.55±0.56 ^{Cc}
C100	6.55±1.07 ^{ABbc}	9.16±0.88 ^{Ab}	4.69±0.71 ^{Bb}	3.65±0.64 ^{Bc}	4.44±0.18 ^{Bd}
C140	5.16±0.22 ^{Bc}	9.01±0.37 ^{Ab}	5.37±0.70 ^{Bb}	4.32±0.64 ^{Bc}	—

注:不同大写字母表示同一浓度处理组不同胁迫时间差异显著($P < 0.05$),不同小写字母表示同一测试时间不同处理组间差异显著($P < 0.05$)
 Note: Different capital superscripts denoted significant difference ($P < 0.05$) among the same group at different test time, and the lowercase superscripts denoted significant difference ($P < 0.05$) among the treatments at the same test time

低趋势,具体表现为 C20 组中青蟹肝胰腺中 CAT 活力整体高于对照组及各处理组。

由表 5 可知。亚硝酸盐胁迫可导致青蟹肌肉中 CAT 活力短暂升高并显著高于对照组($P < 0.05$),

表 5 亚硝酸盐胁迫对拟穴青蟹肌肉 CAT 活力的影响

Table 5 Effects of nitrite stress on CAT activity in the muscle of *Scylla paramamosain*

处理组 Groups	CAT 活力 CAT activity				
	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h
C0	6.34±0.65 ^{bc}	6.48±0.39 ^b	6.05±0.32 ^{ab}	7.01±0.36 ^a	7.04±0.43 ^b
C20	5.51±0.54 ^{Bc}	5.04±0.93 ^{Bb}	7.64±1.53 ^{ABa}	6.28±0.41 ^{ABab}	8.50±0.42 ^{Aa}
C60	5.94±0.62 ^{Bbc}	10.35±0.09 ^{Aa}	5.08±0.18 ^{Bb}	4.86±0.54 ^{Bc}	3.86±0.29 ^{Bc}
C100	7.48±0.69 ^{Bb}	10.88±0.38 ^{Aa}	4.37±0.57 ^{Cb}	5.32±0.18 ^{Cbc}	3.93±0.41 ^{Cc}
C140	10.85±0.14 ^{Aa}	8.84±0.56 ^{Ba}	4.90±0.30 ^{Cb}	5.55±0.46 ^{Cbc}	—

注:不同大写字母表示同一浓度处理组不同胁迫时间差异显著($P < 0.05$),不同小写字母表示同一测试时间不同处理组间差异显著($P < 0.05$)
 Note: Different capital superscripts denoted significant difference ($P < 0.05$) among the same group at different test time, and the lowercase superscripts denoted significant difference ($P < 0.05$) among the treatments at the same test time

由表 6 可知,随胁迫时间增加,C60、C100、C140 组拟穴青蟹鳃中 CAT 活力不断下降,C20 组却表现为先降低后升高趋势,在胁迫 24 h 以后,其余各处理组均显著低于对照组、C20 组($P < 0.05$);C100 组在

表 6 亚硝酸盐胁迫对拟穴青蟹鳃 CAT 活力的影响

Table 6 Effects of nitrite stress on CAT activity in the gill of *Scylla paramamosain*

处理组 Groups	CAT 活力 CAT activity				
	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h
C0	8.96±0.31 ^{ab}	9.08±0.31 ^a	7.53±0.64 ^a	8.96±0.42 ^b	9.21±0.24 ^b
C20	10.12±0.75 ^{Ba}	6.75±0.29 ^{Cb}	8.83±0.27 ^{Ba}	10.60±0.26 ^{Ba}	14.29±1.04 ^{Aa}
C60	10.13±0.49 ^{Aa}	9.23±0.59 ^{Aa}	7.16±0.55 ^{Ba}	5.60±0.38 ^{Bc}	5.46±0.61 ^{Bc}
C100	7.90±0.65 ^{Ab}	6.29±0.50 ^{Bbc}	3.84±0.31 ^{Cb}	3.30±0.28 ^{Cd}	2.84±0.41 ^{Cd}
C140	8.27±0.60 ^{Aab}	5.07±0.39 ^{Bc}	5.08±0.89 ^{Bb}	3.68±0.52 ^{Bd}	—

注:不同大写字母表示同一浓度处理组不同胁迫时间差异显著($P < 0.05$),不同小写字母表示同一测试时间不同处理组间差异显著($P < 0.05$)
 Note: Different capital superscripts denoted significant difference ($P < 0.05$) among the same group at different test time, and the lowercase superscripts denoted significant difference ($P < 0.05$) among the treatments at the same test time

2.3 亚硝酸盐胁迫对拟穴青蟹肝胰腺、肌肉和鳃中 MDA 含量的影响

亚硝酸盐胁迫下,拟穴青蟹肝胰腺、鳃中 MDA

且随胁迫浓度的升高,青蟹肌肉中 CAT 活力达最高值所需时间也越来越短。在胁迫 48 h 时,对照组与 C20 组差异显著($P < 0.05$),在其余胁迫时间下对照组与 C20 组无显著性差异($P > 0.05$)。

胁迫 3 h 时与胁迫 24 h、48 h 相比差异显著($P < 0.05$);在各个胁迫时间下,C20 组与对照组相比差异均不显著($P > 0.05$)。

含量均出现显著性变化($P < 0.05$),肌肉中 MDA 含量变化不显著($P > 0.05$)。由表 7 可知,随胁迫时间增加,各处理组拟穴青蟹肝胰腺中 MDA 含量不断

升高,除 C20 组外,其余处理组在各胁迫时间下肝胰腺组织中 MDA 含量均显著高于对照组 ($P < 0.05$);

表 7 亚硝酸盐胁迫对拟穴青蟹肝胰腺 MDA 含量的影响

Table 7 Effects of nitrite stress on MDA content in the hepatopancreas of *Scylla paramamosain*

处理组 Groups	MDA 含量 MDA content				
	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h
C0	1.09±0.05 ^d	1.05±0.09 ^e	1.15±0.06 ^c	1.05±0.07 ^c	1.11±0.11 ^c
C20	1.01±0.04 ^{Dd}	1.80±0.07 ^{Cd}	5.16±0.45 ^{Ba}	5.87±0.20 ^{Bb}	6.89±0.10 ^{Ab}
C60	1.71±0.13 ^{Ec}	2.60±0.07 ^{Dc}	3.46±0.14 ^{Cb}	5.39±0.18 ^{Bb}	7.57±0.08 ^{Aa}
C100	2.18±0.05 ^{Db}	3.26±0.21 ^{Cb}	3.88±0.21 ^{Cb}	6.11±0.20 ^{Bb}	8.02±0.38 ^{Aa}
C140	3.01±0.14 ^{Db}	4.14±0.14 ^{Ca}	5.98±0.30 ^{Ba}	7.92±0.35 ^{Aa}	—

注:不同大写字母表示同一浓度处理组不同胁迫时间差异显著 ($P < 0.05$),不同小写字母表示同一测试时间不同处理组间差异显著 ($P < 0.05$)
 Note: Different capital superscripts denoted significant difference ($P < 0.05$) among the same group at different test time, and the lowercase superscripts denoted significant difference ($P < 0.05$) among the treatments at the same test time

如表 8 所示,在亚硝酸盐胁迫下,各处理组拟穴青蟹鳃中 MDA 含量随胁迫时间与胁迫浓度的增加,呈显著上升趋势 ($P < 0.05$),与对照组相比,除 48 h 外,C20 在其余胁迫时间下拟穴青蟹鳃中 MDA 含量

表 8 亚硝酸盐胁迫对拟穴青蟹鳃 MDA 含量的影响

Table 8 Effects of nitrite stress on MDA content in the gill of *Scylla paramamosain*

处理组 Groups	MDA 含量 MDA content				
	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h
C0	0.60±0.04 ^c	0.68±0.28 ^b	0.65±0.05 ^d	0.64±0.08 ^d	0.60±0.07 ^c
C20	0.51±0.06 ^{Dc}	0.79±0.50 ^{Cb}	0.86±0.03 ^{BCcd}	1.01±0.06 ^{ABcd}	1.09±0.09 ^{Ab}
C60	0.71±0.10 ^{Cc}	0.92±0.64 ^{Cb}	0.93±0.03 ^{Cc}	1.31±0.11 ^{Bbc}	2.18±0.09 ^{Aa}
C100	1.01±0.10 ^{Cb}	1.50±0.60 ^{BCa}	1.51±0.08 ^{BCb}	1.63±0.13 ^{Bb}	2.41±0.20 ^{Aa}
C140	1.44±0.07 ^{Ca}	1.80±0.14 ^{Ca}	2.22±0.13 ^{Ba}	3.14±0.21 ^{Aa}	—

注:不同大写字母表示同一浓度处理组不同胁迫时间差异显著 ($P < 0.05$),不同小写字母表示同一测试时间不同处理组间差异显著 ($P < 0.05$)
 Note: Different capital superscripts denoted significant difference ($P < 0.05$) among the same group at different test time, and the lowercase superscripts denoted significant difference ($P < 0.05$) among the treatments at the same test time

3 讨论

甲壳类动物体内生理与免疫系统正常运转与其所处水环境联系紧密,温度、pH 值、亚硝酸盐浓度等环境因子的波动极易引起甲壳类应激反应,并导致自身免疫力下降,病菌易感性升高^[15]。目前普遍高氮的养殖水体中,亚硝酸盐可由氨经亚硝化细菌作用转化而成,也可由硝酸盐经反硝化细菌转化而成,水中多种水化学因子均可通过影响这两种细菌而导致亚硝酸盐的积累^[16]。

3.1 亚硝酸盐对拟穴青蟹各组织中 AKP 活力的影响

AKP 为机体水解酶体系的组成部分,是机体物质代谢的重要酶类^[17],同时其在机体各级非特异性免疫应答中也起着重要作用^[18]。当三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 受环境因子波动或病原入侵时,其体内血淋巴中 AKP 活性明显升高,并产生一系列适应性调节措施,进而发挥免疫功能^[19]。李玉全等^[20]对脊尾白虾 (*Exopalaemon*

在相同胁迫时间下,随亚硝酸盐浓度升高,拟穴青蟹肝胰腺中 MDA 含量也呈升高趋势。

均无显著性差异 ($P > 0.05$),C60 在胁迫 12 h 以后开始与对照组呈现显著性差异 ($P < 0.05$),C100、C140 组在各胁迫时间下均与对照组差异显著 ($P < 0.05$)。

carinicauda) 进行研究发现,当盐度骤变时,其体内 AKP 活力随时间推进有较大波动,进而对脊尾白虾磷代谢途径产生显著影响。本实验分析发现,当亚硝酸盐浓度达 60 mg/L 以上时,拟穴青蟹肝胰腺及肌肉中 AKP 活力变化显著,其中肌肉中 AKP 活力呈现先升高后降低的趋势,这表明拟穴青蟹受亚硝酸盐胁迫影响,可诱导其体内 AKP 活力升高,进而发挥免疫调节作用,当胁迫时间过长,浓度过高时,AKP 活力显著降低,这表明高浓度亚硝酸盐可严重影响拟穴青蟹体内水解酶体系的正常运转,进而影响其机体抗病能力,这一结果与三疣梭子蟹^[19]、红螯光壳螯虾^[8]受环境胁迫所表现的机体反应较为一致。

3.2 亚硝酸盐对拟穴青蟹各组织中 CAT 活力的影响

CAT 为机体重要的抗氧化酶,与超氧化物歧化酶相互关联并联合清除体内活性氧自由基,使机体免受伤害,CAT 活力下降,通常标志着机体清除自由基的能力下降^[21]。本实验结果表明,拟穴青蟹在高浓度亚硝酸盐环境中,体内 CAT 活性变化趋势为先升

高后降低,但在 20 mg/L 浓度下,其体内各组织中 CAT 活性非但没有下降,反而有升高趋势,表现为“毒性兴奋效应”^[22],这可能是低浓度亚硝酸盐可刺激拟穴青蟹机体内抗氧化酶体系的运转,进而使机体快速清除胁迫所产生的活性氧,增强机体抵抗力。黄海涛^[14]通过对拟穴青蟹进行亚硝酸盐胁迫发现,低浓度亚硝酸盐不会对其蜕壳与存活率产生较大影响,甚至还有一定促进作用,高浓度组却可严重影响其存活与蜕壳,结合本实验分析,这可能也与上述“毒性兴奋效应有关”,但也说明高浓度亚硝酸盐可通过破坏抗氧化系统运转从而对拟穴青蟹产生严重危害。

3.3 亚硝酸盐对拟穴青蟹各组织中 MDA 含量的影响

MDA 为脂质过氧化产物之一,被广泛用作氧化胁迫中细胞膜氧化损伤的评价指标^[23]。有研究表明,亚硝酸盐等环境污染因子的波动可引起机体活性氧的增加^[24],而大量积累的活性氧自由基可进一步攻击周围生物分子,使蛋白变性、脂质过氧化,最终使机体抗病能力下降甚至死亡^[25]。在本研究中,拟穴青蟹肝胰腺和鳃组织中 MDA 含量随胁迫时间增加、胁迫浓度升高而增高,这表明亚硝酸盐可促进拟穴青蟹机体内脂质过氧化的发生,进而对拟穴青蟹产生毒害作用,这与洪美玲等^[7]对中华绒螯蟹研究结果一致。

4 结论

综上所述,高浓度的亚硝酸盐可通过破坏拟穴青蟹组织中 AKP 水解磷酸化作用,抑制机体内 CAT 的抗氧化效应,促进机体内脂质过氧化的发生,进而破坏拟穴青蟹生理生化、免疫系统及细胞膜的完整性,威胁着拟穴青蟹的健康生长。在拟穴青蟹人工养殖中,将亚硝酸盐控制在 20 mg/L 以下,将有助于青蟹工厂化养殖的发展,促进青蟹养殖模式的调整与产业化升级。

参考文献:

[1] 中华人民共和国农业部渔业局. 中国渔业统计年鉴 2006—2014[M]. 北京:中国农业出版社,2006-2014.
Fisheries Bureau of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. China fishery statistical yearbook 2006—2014 [M]. Beijing: China Agriculture Press,2006-2014.

[2] KROUPOVA H, MACHOVA J, SVOBODOVA Z. Nitrite influence on fish: A review[J]. Vet Med-Czech, 2005,50(11):461-471.

[3] JENSEN F B. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals[J]. Comparative Biochemis-
广西科学 2017 年 8 月 第 24 卷第 4 期

try and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology,2003,135(1):9-24.

[4] WANG W N, WANG A L, ZHANG Y J, et al. Effects of nitrite on lethal and immune response of *Macrobrachium nipponense* [J]. Aquaculture, 2004, 232 (1/2/3/4):679-686.

[5] 陈爱平. 2005 年中国水产养殖病害监测报告(三)[J]. 中国水产, 2006(8):64-66.
CHEN A P. China aquaculture disease monitoring report in 2005(3)[J]. China Fisheries, 2006(8):64-66.

[6] 曾媛媛. 环境因子对拟穴青蟹生理生化影响[D]. 厦门:厦门大学,2009.
ZENG Y Y. Effects of the environmental factors on physiology-biochemistry of *Scylla paramamosain* [D]. Xiamen: Xiamen University, 2009.

[7] 洪美玲, 陈立侨, 孙新谨, 等. 亚硝酸盐急性胁迫对中华绒螯蟹幼体相关免疫指标和应激蛋白(HSP70)表达的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(5):688-693.
HONG M L, CHEN L Q, SUN X J, et al. Effects of acute nitrite exposure on immunity indicators and HSP70 expression in Chinese Mitten-hand Crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2011, 17(5):688-693.

[8] 吕晓燕, 李嘉尧, 方燕, 等. 亚硝酸盐对红螯光壳螯虾不同组织免疫相关酶活性及超微结构的影响[J]. 水产学报, 2010, 34(12):1812-1820.
LV X Y, LI J Y, FANG Y, et al. Nitrite stress on immune-related enzymes and the ultrastructure in different tissue of redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(12):1812-1820.

[9] ROMANO N, ZENG C S. Subchronic exposure to nitrite, potassium and their combination on survival, growth, total haemocyte count and gill structure of juvenile blue swimmer crabs, *Portunus pelagicus* [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2009, 72(4):1287-1295.

[10] 陈家长, 臧学磊, 孟顺龙, 等. 亚硝酸盐氮胁迫对罗非鱼(GIFT *Oreochromis niloticus*)血清非特异性免疫酶活性的影响[J]. 生态环境学报, 2012, 21(5):897-901.
CHEN J Z, ZANG X L, MENG S L, et al. Effect of nitrite nitrogen stress on the activities of nonspecific immune enzymes in serum of tilapia (GIFT *Oreochromis niloticus*) [J]. Ecology and Environmental Sciences, 2012, 21(5):897-901.

[11] SVOBODOVÁ Z, MÁCHOVÁ J, POLESZCZUK G, et al. Nitrite poisoning of fish in aquaculture facilities with water-recirculating systems[J]. Acta Veterinaria Brno, 2005, 74(1):129-137.

[12] 蔡小辉, 彭银辉, 宋忠魁, 等. 拟穴青蟹群体遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 广西科学, 2011, 18(4):376-379.
CAI X H, PENG Y H, SONG Z K, et al. Genetic diversity of geographic populations of *Scylla paramamosain* based on ISSR makers[J]. Guangxi Sciences, 2011, 18(4):376-379.

[13] 赵鹏, 宋忠魁, 聂振平, 等. 拟穴青蟹形态性状与性腺重

- 量的相关分析[J]. 广西科学, 2013, 20(1): 57-59.
- ZHAO P, SONG Z K, NIE Z P, et al. Correlation analysis between morphometric traits and gonad traits in *Scylla paramamosain* [J]. Guangxi Sciences, 2013, 20(1): 57-59.
- [14] 黄海涛. 温度、盐度、溶解氧、氨氮、亚硝酸盐氮对拟穴青蟹蜕壳的影响[D]. 广州: 广东海洋大学, 2011: 37-44.
- HUANG H T. Effects of temperature, salinity, dissolved oxygen, ammonia-N and nitrite-N on the molting of *Scylla paramamosain* [D]. Guangzhou: Guangdong Ocean University, 2011: 37-44.
- [15] 管晓娟. 甲壳动物体液免疫相关酶及免疫因子研究概况[J]. 生命科学仪器, 2009, 7(6): 3-7.
- GUAN X J. Progress on the researches of humoral immunity of crustacean [J]. Life Science Instruments, 2009, 7(6): 3-7.
- [16] 郭增华, 王秋燕. 亚硝酸盐氮对方斑东风螺毒性的研究[J]. 海洋水产研究, 2006, 27(6): 88-92.
- GUO Z H, WANG Q Y. Study on the toxicity of nitrite nitrogen to *Babylonia areolata* [J]. Marine Fisheries Research, 2006, 27(6): 88-92.
- [17] 刘树青, 江晓路, 牟海津, 等. 免疫多糖对中国对虾血清溶菌酶、磷酸酶和过氧化物酶的作用[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(3): 278-283.
- LIU S Q, JIANG X L, MOU H J, et al. Effects of immunopolysaccharide on LSZ, ALP, ACP and POD activities of *Penaeus chinensis serum* [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1999, 30(3): 278-283.
- [18] 陈家长, 臧学磊, 胡庚东, 等. 氨氮胁迫下罗非鱼(GIFT Oreochromis niloticus)机体免疫力的变化及其对海豚链球菌易感性的影响[J]. 生态环境学报, 2011, 20(4): 629-634.
- CHEN J Z, ZANG X L, HU G D, et al. The immune response of GIFT *Oreochromis niloticus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in different ammonia [J]. Ecology and Environmental Sciences, 2011, 20(4): 629-634.
- [19] 邹广众, 孙虎山. 水产甲壳动物免疫学研究进展与前景展望[J]. 生命科学仪器, 2009, 7(6): 17-21.
- ZOU G Z, SUN H S. Research advances and prospect in aquatic crustaceans immunology [J]. Life Science Instruments, 2009, 7(6): 17-21.
- [20] 李玉全, 李永生, 赵法箴. 盐度渐变与骤变对脊尾白虾渗透、代谢及免疫相关酶活力的影响[J]. 生态学报, 2015, 35(21): 7229-7235.
- LI Y Q, LI Y S, ZHAO F Z. Effect of salinity changes on osmotic-, metabolic-, and immune-related enzyme activities in *Exopalaemon carinicauda* [J]. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(21): 7229-7235.
- [21] SIES H. Oxidative stress II: Oxidants and antioxidants [M]. New York, USA: Academic Press, 1991: 58-73.
- [22] STEBBING ARD. Hormesis-the stimulation of growth by low levels of inhibitors [J]. Science of the Total Environment, 1982, 22(1): 213-234.
- [23] LEPAGE G, MNUOZ G, CHAMPAGNE J, et al. Preparative steps necessary for the accurate measurement of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography [J]. Analytical Biochemistry, 1991, 197(2): 277-283.
- [24] BRAUNBECK S, BRUNO H. Fish ecotoxicology [M]. Basel, Switzerland: Birkhäuser Publishers, 1998: 203-224.
- [25] HALLIWELL B, GUTTERIDGE J M C. Free radicals in biology and medicine [M]. New York: Oxford University Press, 2015.

(责任编辑: 尹 闯)

(上接第 381 页 Continue from page 381)

- [18] 雷德柱, 高大维, 于淑娟. 植物油和脂肪酸对灰树花深层发酵的作用[J]. 微生物学通报, 2002, 29(1): 19-22.
- LEI D Z, GAO D W, YU S J. Effect of vegetable oil and fatty acid on the submerged fermentation of *Grifola frondosa* [J]. Microbiology, 2002, 29(1): 19-22.
- [19] 徐鹏, 钱竹, 董亮, 等. 灵芝深层发酵生产胞外多糖和灵芝酸的动力学分析[J]. 应用与环境生物学报, 2008, 14(4): 562-565.
- XU P, QIAN Z, DONG L, et al. Kinetic analysis of exopolysaccharide and ganoderic acid production by submerged culture of *Ganoderma lucidum* [J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2008, 14(4): 562-565.
- [20] PARK J P, KIM S W, HWANG H J, et al. Stimulatory effect of plant oils and fatty acids on the exo-biopolymer production in *Cordyceps militaris* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 31(3): 250-255.
- [21] YANG H L, WU T X, ZHANG K C. Enhancement of mycelial growth and polysaccharide production in *Ganoderma lucidum* (the Chinese medicinal fungus, Lingzhi) by the addition of ethanol [J]. Biotechnology Letters, 2004, 26(10): 841-844.

(责任编辑: 陆 雁)