

文章编号: 1004 - 7271(2001)03 - 0218 - 05

氨氮对九孔鲍过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活力的影响

陈昌生, 王淑红, 纪德华, 宋振荣, 陈政强, 郑永启, 贾锡伟

(集美大学水产生物技术研究, 福建 厦门 361021)

摘要:通过测定不同氨氮条件下的九孔鲍内脏囊中的过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)活力, 观察氨氮对九孔鲍 CAT 和 SOD 酶活力的影响。实验结果表明:不同氨氮浓度下的这两种酶活力不同, CAT 活力随氨氮浓度的升降而变化, 当氨氮浓度为 3 ~ 4mg/L 时, 其活力高于对照组, 当浓度增大至 5 ~ 6mg/L 时, CAT 活力低于对照组; 在氨氮为 1 ~ 4mg/L 时, SOD 活力随氨氮浓度增大而上升, 在 4mg/L 时达到最大, 而当氨氮增至 5 ~ 6mg/L 时, SOD 活力下降。不同温度下的氨氮浓度对九孔鲍的 CAT 和 SOD 酶活力变化也有一定的影响。

关键词:九孔鲍; 氨氮; 过氧化氢酶; 超氧化物歧化酶

中图分类号: S917 文献标识码: A

Effects of ammonia-N on activities of CAT and SOD in *Haliotis diversicolor supertexta*

CHEN Chang-sheng, WANG Shu-hong, JI De-hua, SONG Zhen-rong,
CHEN Zheng-qiang, ZHENG Yong-qi, JIA Xi-wei
(Institute of Fishery Biotechnology, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The activities of CAT and SOD and the effects of the activities of CAT and SOD under the different conditions of $\text{NH}_3\text{-N}$ in internal sac of *Haliotis diversicolor supertexta* were investigated. The results showed that the activities of CAT and SOD were different in the varying concentrations of $\text{NH}_3\text{-N}$, and the activities of CAT declined with the increasing of the concentrations of $\text{NH}_3\text{-N}$. When the concentrations of $\text{NH}_3\text{-N}$ was 1 - 4 mg/L, the activity of CAT was higher than that of the control group, and when 5 - 6 mg/L, the activity of CAT was lower than that of the control group, on the other hand, when the concentrations of $\text{NH}_3\text{-N}$ was 1 - 4 mg/L, the activities of SOD increased with the increasing of the concentrations of $\text{NH}_3\text{-N}$, and when 4mg/L, the activities of SOD were maximum, and when 5 - 6mg/L, the activities of SOD declined. The activities of CAT and SOD of abalone also were affected by the concentrations of $\text{NH}_3\text{-N}$ at the different temperatures.

Key words: *Haliotis diversicolor supertexta*; $\text{NH}_3\text{-N}$; CAT; SOD

近年来,福建、广东发生了九孔鲍(*Haliotis diversicolor supertexta*)暴发性流行性疾病,严重影响了九孔鲍工厂化养殖的发展。水质环境恶化是诱变病害的因素之一,氨氮是水产养殖中重要的水体环境指标,它的变化对鲍的生长、代谢和免疫力有一定的影响。养殖水体中残饵、排泄物等有机物经微生物分解后

收稿日期: 2000-07-28

资助项目: 国家科技部资助项目(85-01-14)、福建省科委资助项目(98-Z-102)

第一作者: 陈昌生(1957-),男,福建平潭人,教授,主要从事海水经济动植物地养殖研究。E-mail: cschen@jmu.edu.cn

产生了大量氨氮、硫化氢以及亚硝酸氮等物质,其中氨氮量增加尤为显著,氨氮已成为水产经济动物养殖中的常见胁迫因子^[1]。有关氨氮对鱼类、对虾等水产生物抗病力影响的研究已有不少报道,丁美丽等^[2]和林林等^[3]认为对虾在有机胁迫环境中,虾体内与抗病力有关的酶活力明显下降,对病原体的易感性提高。有关氨氮对九孔鲍酶活力的影响尚未见过报道,本文就氨氮对九孔鲍过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)酶活力的影响方面开展研究,以期改善鲍的养殖环境,减少氨氮毒害,提高鲍的抗病能力方面提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用的九孔鲍购自同安大嶝养鲍场,鲍健康、无病、活力好,其壳长为23~27mm,体重为2.3~2.6g,经室内暂养后用于以下实验。

1.2 方法

1.2.1 用具和具体操作

用孔径为2mm×2mm的聚氯乙烯网片制成50cm×40cm×20cm的网箱,架设于60L的塑料箱中,每个网箱分隔成2个小网箱,用作平行组试验,每个小网箱底部放一片带孔的塑料波纹板作为鲍的附着基,每箱投放一气石。每天全换水并清除排泄物和残饵,换水后加入硫酸铵,调节氨氮浓度,对照组不加,每天投喂沙菜(*Hypnea* sp.)作为饵料。不同温度的试验分为15℃、18℃、21℃、24℃、27℃和30℃六个组,每组放鲍30个(内设平行组),氨氮浓度控制在2.9~3.0mg/L,实验周期为8d;不同氨氮浓度试验分1、2、3、4、5、6mg/L六组,另设对照组,每组放鲍30个(内设平行组),Wt为24℃,实验周期为8d。

1.2.2 酶样的制备

将每个试验鲍(每组取8个鲍,并设平行组)进行解剖,取出内脏囊。按1:5(重量/体积)的比例加入双蒸水,冰浴中匀浆,在4℃下,经高速冷冻离心机(11 500r/min,4℃,30min)条件下离心后,取上清液作为粗酶液,进行CAT酶的活力和蛋白质含量测定。以0.1mL粗酶液+0.3mL冷双蒸水+0.1mL冷无水乙醇+0.1mL冷氯仿,充分混匀后,在4℃下离心(3 000 r/min)10 min,取上清液进行SOD酶的活力及其蛋白含量测定。酶样在超低温冰箱(-80℃)里保存备用。

1.2.3 过氧化氢酶(CAT)活力测定

按徐镜波等^[4]紫外分光光度法改进后进行测定:用贝克曼DU-520紫外可见分光光度计测定九孔鲍内脏囊的CAT活力。(λ=250nm,读数间隔5s,25±1℃,反应1min,每个样均测定三次,取其平均值。)CAT酶能催化H₂O₂生成H₂O和O₂,根据测定时间内的H₂O₂消耗量,即可算出CAT酶的活力。一个单位的CAT酶定义为:在25℃、100s内使H₂O₂分解一半的酶蛋白量。

1.2.4 超氧化物歧化酶(SOD)活力的测定

采用核黄素-NBT光还原法^[5],但略有改动,采用自制的光照盒(60cm×15cm×12cm,内部白色,用18W荧光灯管),光照强度为3 800lx,光照时间8min。以DU-520紫外分光光度计于λ=560nm处比色测定光吸收值,然后取其平均值。一个酶活力单位定义为:在实验条件下,NBT被SOD抑制50%所需的酶蛋白量。

测定CAT和SOD活性过程中,需测定酶样的蛋白含量,本实验选用Bradford比色法测定。

1.2.5 数据处理

实验结果采用数理统计法,将不同实验组的酶活力的差异显著性进行F检验。数据的处理采用Microsoft Excel 5.0的数据分析工具,在586IBM兼容微机上实现。

2 结果

2.1 不同水温下的氨氮对 CAT 酶活力的影响

从表1可知,鲍内脏囊中的CAT活力,在15~24℃时,随温度的升高而上升,当水温为27℃时,CAT酶活力达到最大,高于27℃,CAT酶活力随着温度的升高而有明显下降。18℃、21℃、24℃、27℃的CAT酶活力分别比15℃的高3.99%、21.93%、27.75%和43.05%。而30℃的CAT活力比27℃和15℃的分别下降了44.17%和20.13%。

表1 不同温度下CAT酶活力变化

Tab.1 Variation of CAT in different temperatures

(NH₃-N, 3mg/L)

温度(℃)	15 [*]	18 [*]	21 ^{**}	24 ^{**}	27	30 [*]
CAT活力(U/mg)	57.09	59.37	69.61	72.39	81.67	45.60
Pro含量(mg/mL)	7.217	7.525	7.265	7.947	7.973	8.74

注: *表示F检验(相对27℃组)差异显著($P < 0.05$); **表示F检验(相对27℃组)差异高度显著($P < 0.01$)。

2.2 不同水温下的氨氮浓度对 SOD 酶活力的影响

在15~30℃时,鲍内脏囊中的SOD活力随温度的升高而上升(见表2),18℃、21℃、24℃、27℃和30℃的SOD酶活力分别比15℃的高出4.88%、14.5%、22.61%、23.68%和31.29%。

表2 不同温度下SOD酶活力变化

Tab.2 Variation of SOD in different temperatures

(NH₃-N, 3mg/L)

温度(℃)	15	18	21	24	27	30 [*]
SOD活(U/mg)	4.366	4.579	4.999	5.353	5.400	5.732
Pro含量(mg/mL)	1.261	1.406	1.432	1.115	1.246	0.990

注: *表示F检验(相对27℃组)差异显著。

2.3 不同氨氮浓度对 CAT 酶活力的影响

鲍内脏囊中的CAT活力随氨氮浓度的升高而有明显下降,当氨氮浓度为1~4 mg/L时,其CAT活力高于对照组,当氨氮增大到5~6 mg/L时,CAT活力却低于对照组(见表3),当氨氮浓度为1、2、3、4 mg/L时,鲍的CAT活力分别比对照组高了30.7%、20.47%、18.3%和7.51%,当氨氮浓度为5~6 mg/L时,CAT活力分别比对照组降低了2.61%和4.89%。

表3 不同氨氮浓度下CAT酶活力变化

Tab.3 Variation of CAT in different ammonia-N

(24℃)

氨氮浓度(mg/L)	1	2	3	4	5	6	对照组
CAT活力(U/mg)	82.12	75.69	74.33	67.55	61.19	59.76	62.83
Pro含量(mg/mL)	8.868	7.911	7.729	7.953	7.732	7.200	8.284

2.4 不同氨氮浓度对 SOD 酶活力的影响

从表4可知,鲍内脏囊中的SOD活力呈现出一定的规律性。当氨氮浓度为1~3 mg/L时,SOD活力随温度的升高而上升,当氨氮为4 mg/L时,SOD活力达到最高,而当氨氮浓度增大到5~6 mg/L时,SOD酶的活力却随温度的升高而有明显下降。

表 4 不同氨氮浓度下的 SOD 酶活力变化
Tab.4 Variation of SOD in different ammonia-N (24℃)

氨氮浓度(mg/L)	1	2	3	4	5	6	对照组
SOD 活力(U/mg)	5.455	5.133	5.248	5.859	5.101	4.589	5.272
Pro 含量(mg/mL)	1.223	1.257	1.111	1.134	1.230	1.075	1.040

3 讨论

(1) 超氧化物歧化酶和过氧化氢酶是存在生物体内的两个重要的抗氧化防御性功能酶。当生物暴露于污染物时, 这些污染物参与了体内的氧化还原循环, 并产生大量的活性氧 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 、 $\cdot OH$ 等, 从而导致机体 DNA 断裂, 脂质过氧化、酶失活等一系列氧化损害^[6]。在所有的需氧生物中, 都含有抗氧化防御系统来防止内源代谢活性氧自由基产生。这个系统组成是一些能够被氧应激诱导的酶类, 包括 SOD、CAT 和谷胱甘肽过氧化物酶(Gpx)等^[7,8]。活性氧是生物体内的某些代谢产物, 如 $O_2^{\cdot-}$ 或 $HO_2^{\cdot-}$; H_2O_2 与 $\cdot OH$, 及其衍生物的含氧物质如脂质过氧化产物与单线氧(1O_2), 具有较氧活泼的化学特性^[9], 若不能及时清除, 则会对机体造成氧化损伤, 使机体老化, 抗病能力下降。而 CAT 酶催化 H_2O_2 生成水和氧气, SOD 有清除 $O_2^{\cdot-}$ 的作用, 所以 CAT、SOD 酶活力的变化在一定程度上能反应出机体在胁迫环境的免疫力。

(2) 氨氮是水产养殖系统中普遍存在的有害物质。一些学者认为: 任何可测定出的氨氮浓度对鱼类生成都会产生有害影响^[10]。本实验结果表明: 低浓度氨氮会诱导九孔鲍与抗病力有关的酶 CAT 和 SOD 活力增强, 并且随着浓度增加, 其诱导性也增强, 但达到一定的氨氮浓度后, 继续增加氨氮浓度, 可降低九孔鲍与抗病力有关的酶 CAT 和 SOD 活力(图 1、图 2), 从而提高九孔鲍对病原体的易感性, 增加患病的可能性。另外, 九孔鲍对氨氮的耐受力可能与九孔鲍生理状态有关。孙舰军和丁美丽^[1]认为, 无脊椎动物的氨排泄是反映蛋白质代谢和评价其对各种胁迫因子生理反应的指标。氨氮浓度的上升, 引起血淋巴理化因子变化, 也会改变其中与抗病力有关的酶活力^[11]。因此, 控制氨氮浓度是防治疾病发生的关键措施之一^[1]。

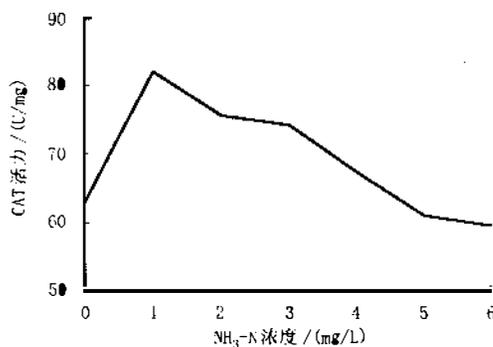


图 1 不同氨氮浓度下鲍的 CAT 活力

Fig.1 The activity of CAT in different ammonia-N

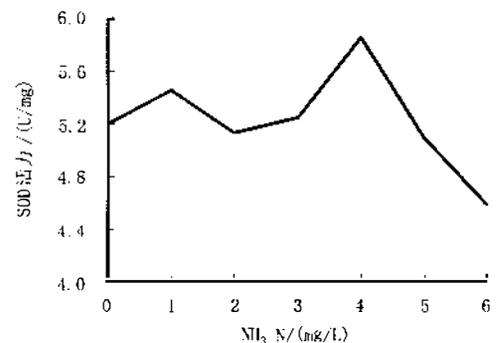


图 2 不同氨氮浓度下鲍的 SOD 活力

Fig.2 The activity of SOD in different ammonia-N

(3) 九孔鲍在不同温度下的摄食、生长及存活有明显差异。据钟幼平等⁽¹⁾报道, 九孔鲍的摄食、壳长与体重的日增长的适宜温度为 18 ~ 30℃, 最适为 27℃。在最适温度内九孔鲍的活力好, 存活率高达 96%。据本实验结果可知: 在 27℃ 九孔鲍与抗病力有关的 CAT、SOD 酶活力达到最高, 使体内活性氧自

(1) 钟幼平、陈昌生 1999, 温度对九孔鲍摄食、生长、存活的影响

由基减少,提高机体对氨氮的耐受力,对病原体的易感性较弱。在适宜的温度内,九孔鲍不易患病,且生长快、存活率高,这一点已经在九孔鲍的工厂化养殖中得到了很好的验证。

(4)在鲍的养殖生产中,由于残饵被微生物分解产生氨及鲍在生长代谢中本身分泌氨,使养殖池的氨氮浓度随着养殖时间的延长而不断升高。致使鲍的CAT和SOD酶活力受到抑制,机体受氧化损伤,抗病力下降。因此,在九孔鲍工厂化养殖中必须严格控制好投饵量,定时清除残饵和排泄物,经常注换新水,以降低养殖池中的氨氮浓度;并通过适宜的措施调节好水体中的溶氧、pH、盐度、水温等,降低氨的毒性^[12,13],为九孔鲍提供良好的生活环境,增强其抗病力,降低其抗病原体的易感性,尽可能减少疾病发生。

参考文献:

- [1] 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): 367-372.
- [2] 丁美丽,林林,李光友,等. 有机污染对中国对虾体内环境研究[J]. 海洋与湖沼, 1997, 28(1): 7-12.
- [3] 林林,丁美丽,孙舰军,等. 有机污染提高对虾对病原敏感性实验[J]. 海洋学报, 1998, 20(1): 90-93.
- [4] 徐镜波,袁晓凡,郎佩珍. 过氧化氢酶活性及活性抑制的紫外分光光度测定[J]. 环境化学, 1997, 16(1): 73-76.
- [5] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase improved assays and an assay applicable to acrylamide gels[J]. Analyst Biochem, 1971, 44(1): 276-287.
- [6] 方允中,李文杰. 自由基与酶[M]. 北京:科学出版社, 1994. 67-69.
- [7] Bugeot T, Boqueue G, Porte C, et al. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea[J]. Marine Ecology Progress Series, 1996, 131: 125-141.
- [8] Peters I D, Livingstone D R. Antioxidant enzyme activities in embryologic and early larval stages of turbot[J]. J Biol, 1996, 49: 986-997.
- [9] 余群,郑微云,翁妍,等. 石油污染对真鲷幼体超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的毒理效应[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1999, 38(3): 429-434.
- [10] Colt J, Tchobanoglous G. Chronic exposure of channel catfish, *Ictalurus punctatus* to ammonia, effects on growth and survival[J]. Aquac, 1978, 15: 353-372.
- [11] Young-Lai W W, Charmanier caures M, Charmanier G, et al. Effect of ammonia on survival and osmoregulation in different life stages of the lobster *Homarus americanus*[J]. Mar Biol, 1991, 110: 293-300.
- [12] Chen J C, Lin C Y. Oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Penaeus chinensis* juveniles exposed to ambient ammonia at different salinity levels[J]. Comp Biochem Physiol, 1992, 102C: 287-291.
- [13] Chen J C, Nan F H. Effect of ambient ammonia on ammonia-N excretion and ATPase activity of *Penaeus chinensis*[J]. Aquat Toxic, 1992, 23: 1-10.

欢迎订阅 2002 年《水产文摘》

《水产文摘》是公开发行的检索性刊物(CN44-1289/S, ISSN1000-6257),取材国内外最新出版的期刊、论文汇编、专著、专利等各种类型文献,及时报道国内外渔业科研、生产新成果、新技术、新水平、新动向,适合科技人员,院校师生等各级水产工作者阅读。

本刊为月刊,每期定价8.00元,全年12期96.00元。邮发代号46-65。可到当地邮局订阅,也可将款汇到《水产文摘》编辑部订阅。

地址:广州市新港西路231号 邮编:510300

电话:(020)84458694

电传:(020)84451442

E-mail: SCWZ@163.net