

氨氮对泥鳅的急性毒性及其肝、鳃组织超微结构的影响

郝小凤, 刘 洋, 凌去非

(苏州大学水产研究所, 江苏 苏州 215123)

摘要:通过急性毒性和胁迫试验,探讨氨氮对泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)的急性毒性及其肝、鳃超微结构的影响,为其养殖水质指标管理提供理论依据。急性毒性试验结果表明,在水温(25 ± 1)℃、pH (8.1 ± 0.1)、溶解氧(6.5 ± 0.5)mg/L时,水中氨氮浓度越高,泥鳅的死亡率越高,其96 h LC₅₀总氨浓度(TAN)为164.4 mg/L,非离子氨(NH₄⁺-N)浓度为2.22 mg/L。胁迫试验结果表明,随着氨氮浓度的变化,试验组泥鳅鳃组织在21 d后出现不同程度的变化;其中,50 mg/L和150 mg/L浓度组的泥鳅鳃表面出现分泌物,细胞水肿;250 mg/L组鳃丝表面分泌物增加,鳃小片聚拢,上皮细胞水肿加剧;450 mg/L组鳃上皮坏死。泥鳅肝脏细胞超微结构在不同氨氮浓度下也出现不同程度的损伤,50 mg/L和150 mg/L组的泥鳅肝脏细胞线粒体扭曲变形,细胞核变形,核膜肿胀;250 mg/L组肝脏细胞胞浆空泡化,残存细胞器的结构不完整;450 mg/L组出现大量肝脏细胞凋亡。随着氨氮胁迫浓度的不断升高,鳃组织和肝细胞超微结构的受损程度逐渐严重,且损伤不可逆转。

关键词:泥鳅;氨氮胁迫;肝脏;鳃;超微结构

中图分类号:Q176 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2012)05-0101-07

泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)属鲤形目、鳅科、花鳅亚科、泥鳅属,广泛分布于池塘、水库、江河和湖泊中(孟庆闻等,1995);因其肉质鲜嫩、味道鲜美、营养丰富,目前在国内外市场广受欢迎(李龙凤和谢宜涛,2008)。

氨氮是我国大部分水系中主要的污染指标。水中氨氮包括离子氨和非离子氨,总氨氮即是这两种形态氨的总和。在总氨氮中,离子氨对鱼类毒性较小,而低浓度的非离子态氨则会对鱼类造成较强的毒性作用,两者在总氨氮中的比例受氨氮质量浓度、pH和温度等因素的影响(中华人民共和国环境保护部,2007)。鱼类集约化养殖过程中,氨氮已成为水产集约化养殖中影响鱼类生长和生存的主要限制因子之一(Colt,2006)。水质中氨氮浓度严重超标将影响水生动物的生长,对水生生物的许多器官造成损伤,甚至导致其发病死亡(Benli et al,2008)。国内外学者就氨氮对鱼类的影响进行了大量的报道,如中华鲟(*Acipenser sineusis*)(杜浩等,2007)、鳙

(*Aristichthys nobilis*)(雷衍之和金送笛,1979)、金鱼(*Carassius auratus*)(王凡等,2010)、白斑狗鱼(*Esox lucius*)(胡萍华等,2010)、大菱鲈(*Psetta maxima*)(曲克明等,2007)等;然而,氨氮对泥鳅的影响却鲜有报道。本研究以泥鳅为试验对象,通过急性毒性试验研究,为泥鳅人工繁育、水产养殖和活鱼运输中的水质管理提供依据;此外,通过研究氨氮胁迫试验对泥鳅超微结构的影响,分析氨氮对泥鳅的毒性机理,进而了解氨氮对其毒害的机制。

1 材料与方法

1.1 试验用鱼

试验鱼采自苏州奥博生物科技有限公司泥鳅繁育基地,系2008年人工繁育的泥鳅子代F₁。挑选健康、活泼和体表无损伤的泥鳅作为试验鱼,体长(12.54 ± 2.31)cm,体重(6.23 ± 1.47)g。至分组试验前,在规格为35 cm×55 cm×45 cm塑料水族箱中适应性暂养1周,暂养期间所用饲料为常熟泉兴营养添加剂有限公司生产的泥鳅颗粒配合饲料(主要成分为优质鱼粉、面粉、豆粉、酵母粉、稳定性多维、有机螯合多矿、免疫增强剂、赖氨酸、食盐和诱食剂),每日投喂2次(8:00,17:00),日投饲量为鱼体总重的2%~3%。暂养期间水温逐渐升至25℃,并保持恒定,用气石连续充气,每天吸污换水1/3。

1.2 急性毒性试验

急性毒性试验在35 cm×55 cm×45 cm的水族

收稿日期:2012-09-21

基金项目:江苏省科技厅项目(BE2009334);苏州市科技局项目(SNG0822)。

通讯作者:凌去非,1965年生,男,博士,副教授。E-mail: Lingqf@suda.edu.cn;刘洋,1985年生,女,硕士,助工。E-mail: yang441966875@yahoo.com.cn

作者简介:郝小凤,1987年生,女,硕士研究生,主要从事水生生物学研究。E-mail: haoxiaofeng@163.com

箱内进行,试验期间不喂食。在经过静水毒性预试验后,设定 NH_4Cl 的质量浓度为 398、501、631、794 和 1 000 mg/L ,并设立 3 组平行。每个水族箱内加水 10 L,放泥鳅 12 尾,试验期间观察泥鳅的活动及中毒症状,并及时将死鱼捞出,分别记录 24、48、72、96 h 的死亡数。试验用水是经过 48 h 曝气的自来水,每 24 h 换水 1 次,水温 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, pH (8.1 ± 0.1) ,光照为室内自然光。

1.3 氨氮胁迫试验

1.3.1 试验组设置 依据氨氮对泥鳅的急性毒性试验结果 96 h LC_{50} 的 10% 为基础,共设 4 个氨氮浓度梯度,分别为 50、150、250、450 mg/L ,氨氮浓度梯度由 10 g/L 的 NH_4Cl 母液稀释之后配成。对照组(不加 NH_4Cl)的总氨氮(TAN)浓度为 0.0573 mg/L ,每个处理 3 个重复,每组试验鱼 35 尾,试验在 35 $\text{cm} \times 55 \text{ cm} \times 45 \text{ cm}$ 的水族箱内进行。试验期间定时投饵,投饵量以使泥鳅达到饱足并有少量剩余为宜,投饵 1 h 后吸出剩余饲料及粪便。水温 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, pH (8.1 ± 0.1) ,光照为室内自然光照,每 24 h 更换所有处理液。

1.3.2 电镜样本采集与处理 试验进行到 21 d 后,分别取对照组和不同氨氮浓度试验组的泥鳅进行活体解剖,取各试验组泥鳅的鳃,经生理盐水漂洗后,放入 2.5% 的戊二醛固定,在 4°C 冰箱固定 12 h,然后用 0.1 mg/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)冲洗 3 次,每次 15 min,用 1% 锇酸固定, 4°C 冰箱保存 2 h,再用 0.1 mg/L 磷酸缓冲液冲洗 3 次,每次 15 min。50% ~ 100% 乙醇逐级脱水,醋酸异戊酯置换,常规临界干燥,真空离子镀膜,在 Philips EM 400 型扫描电镜下观察、拍照。

取各试验组泥鳅的肝脏,切块,经 2.5% 的戊二醛固定,0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)冲洗,置 1% 的锇酸后固定,再用 0.1 mg/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)冲洗,然后用各级乙醇逐级脱水、包埋、定位、超薄切片、染色,置 Philips CM 10 透射电镜下观察和拍照。

1.4 数据分析

急性毒性试验使用 SPSS 16.0 (Statistical Package for Social Sciences 16.0) 处理试验数据,采用直线内插法求出 24、48、72、96 h 半数致死浓度(LC_{50}),安全浓度(SC)的计算公式: $\text{SC} = 0.1 \times 96 \text{ h } \text{LC}_{50}$

本试验中所提及的氨氮是指水环境中的总氨氮浓度,由离子氨和非离子氨组成。通常在计算氨氮的半数致死浓度时还要考虑非离子氨的半数致死浓

度,非离子氨的计算公式(Emerson et al,1975):非离子氨浓度 = 总氨氮浓度/ $[10^{(\text{pKa}-\text{pH})} + 1]$,式中: $\text{pKa} = 0.09018 + 2729.92/\text{T}$ (T 为开氏温度, $\text{T} = 273 + \text{t } ^\circ\text{C}$)

2 结果与分析

2.1 氨氮半致死浓度(LC_{50})的测定

在不同氨氮浓度下,泥鳅的死亡率各不相同,随着浓度的升高,泥鳅的死亡率逐渐上升。氨氮浓度为 134 mg/L 时,24 h 和 48 h 的死亡率均为 0,而当氨氮浓度增加到 336.4 mg/L 时,24、48、72、96 h 的死亡率均达到最大值(72 h 和 96 h 的死亡率均达到了 100%)。对照组在试验期间未见死亡(表 1)。

表 1 不同浓度氨氮对泥鳅的急性毒性试验结果

Tab.1 Results of acute toxicity test of ammonia nitrogen to *M. anguillicaudatus* at difference concentrations

总氨 非离子 浓度/ 氨浓度/		不同处理时间的泥鳅死亡率/%			
mg · L ⁻¹	mg · L ⁻¹	24 h	48 h	72 h	96 h
133.90	1.81	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	8.3 ± 0.2	16.7 ± 0.3
168.60	2.27	4.1 ± 0.3	16.7 ± 0.4	54.2 ± 0.1	62.5 ± 0.1
212.30	2.86	33.3 ± 0.3	41.7 ± 0.3	66.7 ± 0.1	87.5 ± 0.2
267.20	3.60	50.0 ± 0.3	79.2 ± 0.2	79.2 ± 0.2	100.0 ± 0.0
336.40	4.53	83.3 ± 0.4	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0

用直线内插法求出总氨(TAN)和非离子氨($\text{NH}_3\text{-N}$)对泥鳅 24、48、72、96h 的半致死浓度(表 2)。水中总氨对泥鳅的安全浓度是 16.44 mg/L ,非离子氨对泥鳅的安全浓度是 0.22 mg/L 。

表 2 不同处理时间下氨氮对泥鳅的半致死浓度及安全浓度

Tab.2 The median lethal concentrations and safe concentrations of ammonia nitrogen to *M. anguillicaudatus* at difference times

处理 时间/ h	总氨 $\text{LC}_{50}/$ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	非离子氨 $\text{LC}_{50}/$ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	总氨安 全浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	非离子氨安 全浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
24	252.02	3.40		
48	216.99	2.92		
72	186.60	2.51	16.44	0.22
96	164.41	2.22		

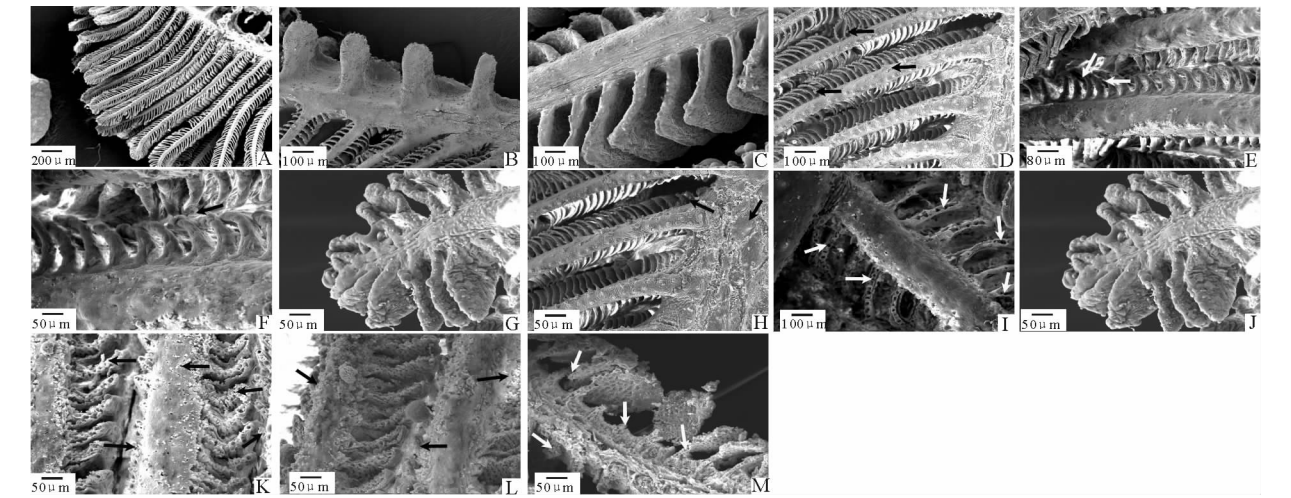
2.2 氨氮胁迫后泥鳅鳃和肝脏组织的电镜观察

2.2.1 鳃组织 对照组泥鳅鳃的基本结构与其它硬骨鱼鳃的基本结构相似(图 1-A,B,C)。鳃主要是由鳃弓、鳃耙、鳃丝、鳃小片组成,位于鳃腔两侧对称排列,形状略似梳子。每一鳃弓外侧有 2 片鳃瓣,每片鳃瓣由许多鳃丝连续排列而成,鳃丝的两侧又有众多的鳃小片重叠排列着。

低浓度组,在 21 d 后泥鳅鳃丝表面出现少量分

分泌物(图 1-D);50 mg/L 组的泥鳅鳃小片前端出现细胞破损(图 1-E);150 mg/L 浓度组泥鳅在 21 d 后鳃组织发生病变,鳃丝表面上皮细胞轮廓不清晰并出现大量分泌物,细胞水肿、隆起并伴有部分坏死脱落组织(图 1-F);250 mg/L 浓度组泥鳅鳃小片聚拢并融合(图 1-G);鳃丝上皮细胞水肿加剧,细胞表面的环形隆嵴消失或不明显(图 1-H);鳃小片上皮细

胞多有脱落(图 1-I);鳃丝上皮细胞出现大量水肿,且鳃丝表面布满大量分泌物(图 1-J);450 mg/L 浓度组的泥鳅在氨氮胁迫 21d 后鳃小片纤维素渗出、呼吸上皮发生变性、坏死,其间充满坏死脱落的上皮细胞、纤维素(图 1-K);鳃小片结构消失(图 1-L),较严重部分出现鳃组织坏死,鳃瓣边缘糜烂、缺损,鳃小片坏死、解体,鳃丝仅剩鳃丝软骨(图 1-M)。



(A) 对照组泥鳅的鳃(×100);(B) 对照组泥鳅鳃的鳃耙(×200);(C) 对照组泥鳅的鳃小片(×200);(D) 50 mg/L 浓度组:鳃丝表面出现少量分泌物(×200);(E) 50 mg/L 浓度组:鳃小片前端出现细胞破损(×250);(F) 150 mg/L 浓度组:鳃丝上皮出现大量分泌物,细胞水肿、伴有部分坏死脱落组织(×400);(G) 250 mg/L 浓度组:鳃小片聚拢并融合(×400);(H) 250 mg/L 浓度组:鳃丝上皮细胞水肿加剧,细胞表面的环形隆嵴消失或不明显(×250);(I) 250 mg/L 浓度组:鳃小片上皮细胞多有脱落(×300);(J) 250 mg/L 浓度组:鳃丝上皮细胞出现大量水肿,且鳃丝表面布满大量分泌物(×200);(K) 450 mg/L 浓度组:呼吸上皮发生变性、坏死,其间充满坏死脱落的上皮细胞、纤维素(×400);(L) 450 mg/L 浓度组:鳃小片结构消失(×400);(M) 450 mg/L 浓度组,鳃组织坏死,鳃瓣边缘可见糜烂、缺损,鳃小片坏死、解体,鳃丝仅剩鳃丝软骨(×400)。

图 1 氨氮对泥鳅鳃组织超微结构的影响

(A) Loach gill from the control group (×100); (B) Gill raker from the control group (×200); (C) Gill lamella from the control group (×200); (D) Group of 50 mg/L: a few of secretions were on the surface of gill (×200); (E) Group of 50 mg/L: broken cells appeared at front of gill lamella (×250); (F) Group of 150 mg/L: there were a lot of secretions and cells edema with piece necrosis (×400); (G) Group of 250 mg/L: gill lamellae gather (×400); (H) Group of 250 mg/L: edema of epithelia cells worsened, and circle carina were lost or not clear (×250); (I) Group of 250 mg/L: epithelial cells of gill lamella fell off (×200); (J) Group of 250 mg/L: lots of epithelia cells edema and secretions (×200); (K) Group of 450 mg/L: denaturation necrosis of respiratory epitheliums, among which there were full of epithelial cells and cellulose (×400); (L) Group of 450 mg/L: the structure of gill lamella disappeared (×400); (M) Group of 450 mg/L: gill tissue necrosis was observed; there were erosions and defects at the edge of gill lamella; gill lamellas were degenerated; there were only cartilage in gill filaments (×400)。

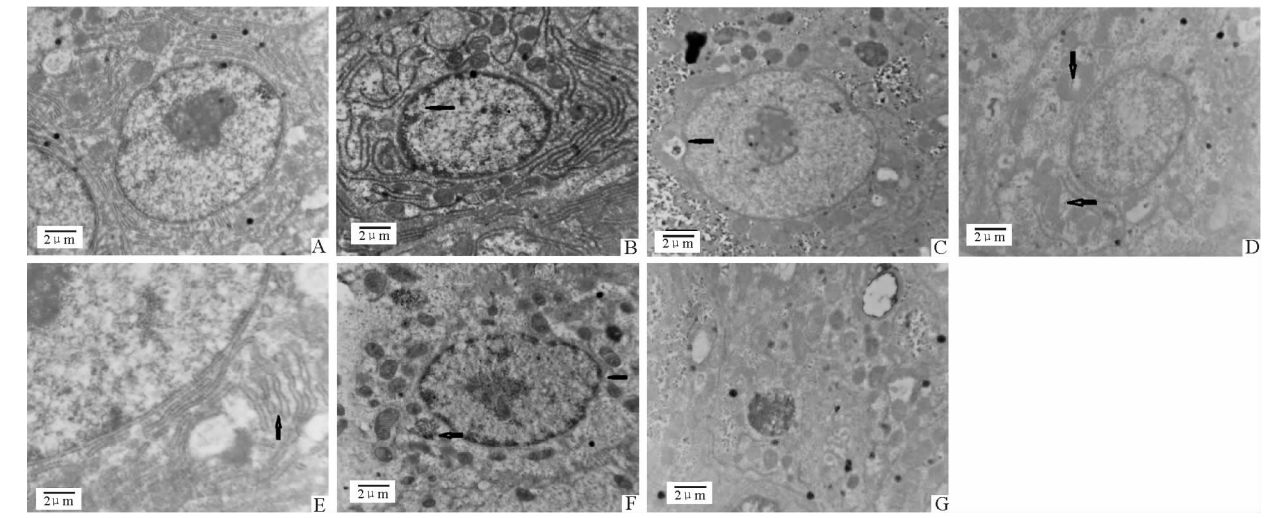
Fig. 1 Effects of ammonia nitrogen on microstructures of *M. anguillicaudatus* gill

2.2.2 肝脏组织的透射电镜观察 观察对照组泥鳅肝细胞的超微结构(图 2-A),发现其结构主要表现为细胞质均匀分布,细胞核呈圆形或椭圆形,位于细胞中央,核膜清晰可见;胞质中含有大量的线粒体,质膜平滑,内有清晰的细管状嵴,高尔基体和溶酶体散布于细胞质中,粗面内质网丰富,呈层状排列,膜表面有核糖体分布。氨氮胁迫的低浓度组(50、150 mg/L)泥鳅肝脏细胞的超微结构出现细胞肿胀、部分细胞核变形、偏离中心,并被挤向细胞边缘,核内染色质增多,且聚集于细胞核中心或边聚于

核膜四周(图 2-B);核膜部分区域有所断裂、破损(图 2-C);150 mg/L 浓度组的肝细胞线粒体数量减少,形状有异常变化,部分线粒体嵴弯曲变形或解体断裂(图 2-D);250 mg/L 浓度组泥鳅的肝细胞在 21 d 后其粗面内质网片断化,部分粗面内质网呈现较大空腔、有进一步膨大的趋势,胞质中含有大量脂滴、糖原颗粒(图 2-E);450 mg/L 浓度氨氮对泥鳅肝细胞损伤主要表现为细胞核形状异常,有的细胞核收缩变形(图 2-F);部分细胞核内外膜不同程度瓦解,个别甚至出现核膜崩解、核内物质外溢现象,

大部分细胞核染色质断裂为不同部分且弥散于核中;肝细胞质内容物大量泄露、空泡化,细胞器极少、残存细胞器的结构不完整,核糖体大部分脱落,胞质

内脂滴相比低浓度组进一步增多,同时出现大量溶酶体和坏死腔,线粒体扭曲程度明显形状不规则,少数出现细胞凋亡现象(图 2-G)。



(A) 对照组:正常肝脏细胞的细胞核、细胞器和细胞膜(×10000);(B) 50 mg/L 浓度组:核内染色质增多,聚于核膜四周(×10000);(C) 150 mg/L 浓度组:核膜部分区域有所断裂、破损(×10000);(D) 150 mg/L 浓度组:肝细胞线粒体数量开始减少,形状有异常变化,线粒体嵴弯曲变形或解体断裂(×10000);(E) 250 mg/L 浓度组:肝细胞粗面内质网片断化,粗面内质网呈现较大空腔(×10000);(F) 450 mg/L 浓度组:细胞核形状异常(×10000);(G) 450 mg/L 浓度组:细胞核内外膜瓦解,核内物质外溢现象,细胞质空泡化,细胞器极少,残存细胞器的结构不完整,出现大量溶酶体和坏死腔,线粒体扭曲,形状不规则,细胞凋亡(×10000)。

图 2 氨氮对泥鳅肝脏超微结构的影响

(A) Group of control; cell nucleus, organelle and membrane of normal hepatic cell (×10000); (B) Group of 50 mg/L; chromatin increased and gathered around nuclear membrane (×10000); (C) Group of 150 mg/L; some areal of the nuclear membrane was broken (×10000); (D) Group of 150 mg/L; mitochondria were decreasing and distorted; crisrae were bending or disintegrated (×10000); (E) Group of 250 mg/L; rough endoplasmic reticulum presented fragmentation, and to show comparatively large space (×10000); (F) Group of 450 mg/L; the structure of nucleus was anomalism (×10000); (G) Group of 450 mg/L; cell plasma was vacuolization; few of cell organelles; lots of lysosomes and necrosis; massive liver cells appeared apoptosis (×10000) .

Fig. 2 Effects of ammonia nitrogen on microstructures of *M. anguillicaudatus* liver

3 讨论

3.1 氨氮对泥鳅的急性毒性

本试验中,氨氮浓度是以总氨氮浓度表示的。泥鳅对氨氮的耐受性与氨氮浓度以及胁迫时间呈线性相关,随着氨氮胁迫时间的延长和氨氮浓度的升高,泥鳅的死亡率不断上升,说明氨氮对泥鳅有较强的生理毒性。

非离子氨对中华鲟稚鱼 24、48、72 和 96 h 的 LC₅₀ 分别为 0.67、0.52、0.43 和 0.39 mg/L (Benli et al,2008);对鳙幼鱼 24 h LC₅₀ 为 0.91 mg/L (杜浩等,2007);对金鱼鱼种 24、48 h 的 LC₅₀ 分别为 0.454、0.267 mg/L (雷衍之和金送笛,1979);对白斑狗鱼 24、48、72、96 h 的 LC₅₀ 分别为 0.613、0.471、0.364、0.333 mg/L (王凡等,2010);然而,在本试验中,非离子氨对泥鳅 24、48、72 和 96 h LC₅₀ 分别高达 3.40、2.92、2.51 和 2.22 mg/L,说明泥鳅对氨氮的

耐受力比中华鲟稚鱼、鳙幼鱼、金鱼和白斑狗鱼等要强,这可能与泥鳅生活于水底层有关。水底层氨氮含量相对较高,长期生活在这种胁迫环境下,其抗氨氮能力可能比中上层鱼类要高;同时,泥鳅可以利用肠道呼吸,这种特殊的呼吸方式可能也有助于其抗击氨氮胁迫。

3.2 氨氮胁迫对泥鳅鳃和肝脏超微结构的影响

3.2.1 氨氮胁迫对泥鳅鳃组织的损伤机理 氨氮对鱼类的毒性作用机制一般认为是水体中的分子氨渗进生物体内,降低了血液的载氧能力,使呼吸机能下降。氨主要侵袭粘膜,特别是鱼鳃表皮和肠粘膜,其次是神经系统,使鱼类等水生动物的肝肾系统遭受破坏,引起体表及内脏充血、肌肉增生及出现肿瘤,严重时发生昏迷以致死亡,即使是低浓度的氨长期接触也会损害鳃组织,出现鳃小片弯曲、粘连或融合现象 (Campa-Córdova et al,2002)。鱼鳃组织受水环境中有毒物质作用而发生损伤基本可划分为两类

(Wong & Wong, 2000): 一是为了防御反应而产生的损伤, 溴氰菊酯对食蚊鱼(*Gambusia affinis*)的早期损伤造成鳃丝上皮细胞肥大、增生, 鳃小片的呼吸上皮水肿等现象即属于此类损伤(Cengiz & Unlu, 2006); 二是直接损伤, 全氟辛烷磺酸(PFOS)急性暴露使斑马鱼(*Danio rerio*)鳃上皮细胞出现坏死和脱落等不可恢复的组织损伤现象即属于此类(胡芹等, 2009)。本试验中, 50 mg/L 浓度组的泥鳅鳃组织损伤属于第一类损伤, 从 150 mg/L 浓度组开始, 泥鳅经氨氮胁迫后, 鳃组织开始出现第二种损伤, 但是该试验组鳃小片分泌物增多, 与外界接触面积降低, 隆起并伴有部分坏死脱落, 既表现为防御反应损伤, 又表现为直接损伤。

3.2.2 氨氮浓度高低对泥鳅鳃组织的损伤差异

50 mg/L 组的泥鳅在 21 d 后鳃丝表面出现少量分泌物, 鳃小片前端出现细胞破损, 并伴有轻度水肿; 150 mg/L 浓度组泥鳅上皮细胞水肿加剧, 鳃组织发生病变, 鳃丝表面上皮细胞轮廓不清晰并出现大量分泌物, 伴有部分坏死脱落组织。刘洋等(2011)曾发现氨氮胁迫会使这 2 个低浓度组鱼鳃组织出现 SOD 和 GSH-PX 酶活性显著低于对照组, 且在 21 d 后均出现了过氧化胁迫现象, 说明这 2 个低浓度虽然没有出现死亡现象, 但长期生活在低浓度的氨氮胁迫环境中, 泥鳅也会受到氨氮毒性的影响, 造成鳃组织产生大量粘液、水肿和损伤等现象, 这些均影响了鳃的正常的新陈代谢功能, 从而造成鳃组织内产生大量的自由基, 随着时间的延长, 大量的自由基得不到及时有效的清除, 就会出现过氧化胁迫; 同时, 低浓度组泥鳅鳃部黏液的过量分泌, 降低了氧越过鳃表面的扩散速率, 长期接触也会损害鳃组织, 出现鳃小片弯曲、粘连和融合现象, 进一步影响其他组织的正常生理功能。250 mg/L 浓度和 450 mg/L 浓度在氨氮胁迫 21 d 后出现的损伤较严重, 且部分坏死组织已超出了泥鳅鳃组织的再生和修复能力, 气体交换受阻, 结合鱼死亡前的挣扎行为, 推测窒息可能是造成鱼死亡的原因之一。由此可见, 氨氮对泥鳅鳃组织的损伤机理主要是通过侵袭黏膜, 造成组织上皮细胞的坏死和微结构的损伤, 从而影响鳃所参与的酸碱平衡、离子运输和含氮废物的排泄等正常生理活动(李建等, 2007)。

3.2.3 氨氮胁迫对泥鳅肝脏超微结构的影响 肝脏是泥鳅最重要的解毒器官(Dutta et al, 1993)。氨氮通过血细胞运输到肝脏后, 主要依靠肝脏的解毒作用来降低其毒性, 肝脏丰富的酶可以将毒性较高

的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的转化为毒性较低的尿素和尿酸(王琨, 2007)。本试验中, 在透射电镜下可以看到氨氮对泥鳅肝细胞超微结构的影响首先是从膜系统和细胞核开始的。50 mg/L 浓度组泥鳅部分肝细胞肿胀, 细胞核变形, 染色质聚集于细胞核中心或核膜四周, 核膜部分区域有所破损; 150 mg/L 浓度组的肝细胞线粒体数量开始减少, 形状有异常变化, 部分线粒体嵴弯曲变形或解体断裂, 在重金属对鱼类的损伤机制研究也发现了类似现象(冯建等, 2004; 王利和汪开毓, 2009)。

3.2.4 氨氮胁迫对泥鳅肝脏酶活性的影响 结合泥鳅在 50、150 mg/L 氨氮胁迫后肝脏的 SOD 和 GSH-PX 酶活性下降的结果(刘洋等, 2011), 推测可能是因为自由基和脂质过氧化水平过高, 造成细胞内的过氧化胁迫, 从而使肝细胞受到损伤。细胞膜系统的主要结构分子是磷脂, 是过氧化物攻击的主要目标之一; 因此推定 50 mg/L 和 150 mg/L 浓度组对泥鳅肝细胞结构的损害可能是过氧化胁迫作用的结果。通过对 250 mg/L 和 450 mg/L 浓度组鳃组织结构的电镜观察发现, 这 2 个浓度组的泥鳅在胁迫 21 d 后鳃丝开始发生严重的病变, 上皮细胞崩溃很可能使胞外的小分子物质大量进入胞内, 经过血液循环运送到肝脏, 使肝脏内的氨氮增加, 造成了肝细胞结构的损伤, 结合这 2 组肝脏中 SOD 和 GSH-PX 酶在胁迫 21 d 普遍下降, 造成鱼过氧化胁迫(刘洋等, 2011); 笔者推测可能是渗进泥鳅鳃组织内的分子氨(NH_3)将血液中血红蛋白分子的 Fe^{2+} 氧化成为 Fe^{3+} , 降低血液的载氧能力, 使呼吸机能下降(冯建等, 2004); 鱼体内的有氧呼吸过程受到影响, 从而导致内脏器官的过氧化胁迫。

3.2.5 氨氮对泥鳅肝脏细胞的损伤机理 在电镜下, 450 mg/L 浓度组肝脏细胞甚至出现大量的细胞凋亡现象, 这些细胞损伤使得肝脏的解毒功能受到影响, 干扰了细胞和一些酶和蛋白的合成过程, 酶数量下降, 细胞膜、线粒体等细胞器膜磷脂双分子层及膜蛋白的结构在受到损伤后也易受活性氧的攻击而遭受破坏, 最终导致细胞崩溃(余瑞兰等, 1999); 肝脏解毒机制失效, 意味着整个解毒途径的崩溃, 泥鳅的死亡率将增加。氨氮胁迫下, 除鳃外受损最严重的就是肝脏细胞, 在氨氮通过鳃表皮的主动吸收和扩散作用进入泥鳅体内后, 非离子氨经血淋巴运输到肝脏细胞进行解毒, 将毒性强的非离子氨经生物酶转化成毒性低的尿酸, 但高浓度的非离子氨在没有转变为尿酸前就开始扩散进入肝脏细胞, 损伤肝

胰腺细胞,细胞结构被破坏,阻碍鸟氨酸循环的进行,鳃上皮受损,肝脏受到损伤,氨氮在体内聚集导致肝脏呈黑色,出现恶臭,这也是泥鳅长经时间氨氮胁迫后死亡的原因之一。

参考文献

- 杜浩,危起伟,刘鉴毅,等. 2007. 苯酚、 Cu^{2+} 、亚硝酸盐和总氨氮对中华鲟稚鱼的急性毒性[J]. 大连水产学院学报, 22(2): 118 - 122.
- 冯健,刘永坚,田丽霞,等. 2004. 草鱼实验性镉中毒对肝胰脏、肾脏和骨骼的影响[J]. 水产学报, 28(2): 195 - 200.
- 胡萍华,金一春,曲学伟,等. 2010. 氨氮对白斑狗鱼成鱼的急性毒性研究[J]. 湖南农业科学, (3): 109 - 177.
- 胡芹,周珍,周群芳,等. 2009. 全氟辛烷磺酸(PFOS)急性暴露对斑马鱼鳃显微结构的影响[J]. 生态毒理学报, (4): 530 - 536.
- 雷衍之,金送笛. 1979. 关于氨对鱼苗的毒性的初步实验[J]. 辽宁淡水渔业, (3): 11 - 12.
- 李凤龙,谢宜涛. 2008. 泥鳅养殖生物学及池塘养殖技术[J]. 吉林渔业, (4): 10 - 12.
- 李建,姜令绪,王文琪,等. 2007. 氨氮和硫化氢对日本对虾幼体的毒性影响[J]. 上海水产大学学报, 16(1): 22 - 27.
- 刘洋,凌去非,于连洋,等. 2011. 氨氮胁迫对泥鳅不同组织SOD和GSH-PX活性的影响[J]. 安徽农业科学, 39(2): 1069 - 1072.
- 孟庆闻,苏锦祥,缪学祖. 1995. 鱼类分类学[M]. 北京: 中国农业出版社.
- 曲克明,徐勇,马绍赛,等. 2007. 不同溶解氧条件下亚硝酸盐和非离子氨对大菱鲶的急性毒性效应[J]. 海洋水产研究, 28(4): 84 - 88.
- 王凡,刘海芳,赵云龙. 2010. 非离子态氨对金鱼鱼种的急性毒性试验[J]. 水产科学, 29(3): 175 - 177.
- 王琨. 2007. 氨氮对鲤(*Cyprinus carpio*)幼鱼组织和血液指标的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学.
- 王利,汪开毓. 2009. 铜对鲤鱼损害的超微结构病理学观察[J]. 黑龙江畜牧兽医, (5): 85 - 90.
- 余瑞兰,聂湘平,石存斌,等. 1999. 分子氨和亚硝酸盐对鱼类的危害及其对策[J]. 中国水产科学, 6(3): 73 - 77.
- 中华人民共和国环境保护部. 2007. 中国水环境质量公报[R/OL]. <http://www.mep.gov.cn/>.
- Benli A K, Köksal G, Özkul A. 2008. Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): Effects on gill, liver and kidney histology [J]. Chemosphere, 72: 1355 - 1358.
- Campa - Córdova A I, Hernández-Saavedra N Y, Ascencio F. 2002. Superoxide dismutase as modulator of immune function in American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 133(4): 557 - 565.
- Cengiz E I, Unlu E. 2006. Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: A microscopic study [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 21(3): 246 - 253.
- Colt J. 2006. Water quality requirements for reuse systems [J]. Aquac Eng, 34: 143 - 156.
- Dutta H M, Adhikari N K, Singh P K, et al. 1993. Histopathological changes induced by malathion in the liver of a freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch) [J]. Bullerin of Environment Contamination and Toxicology, 51: 895 - 900.
- Emerson K, Russo R C, Lund R E, et al. 1975. Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature [J]. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 32: 2379 - 2383.
- Wong C K C, Wong M H. 2000. Morphological and biochemical changes in the gills of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to ambient cadmium exposure [J]. Aquatic Toxicology, 48(4): 517 - 527.

(责任编辑 万月华)

Acute Toxicity Test of Ammonia Nitrogen and Effects of Ammonia-N Stress
on the Ultrastructure of Gill and Liver of *Misgurnus anguillicaudatus*

HAO Xiao-feng, LIU Yang, LING Qu-fei

(Fisheries Research Institute of Soochow University, Suzhou 215123, P. R. China)

Abstract: In order to provide scientific theoretical basis for water quality management during loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) culture, an acute toxicity test of ammonia nitrogen and ammonia-N stress on the microstructures of gill and liver of loach were studied. Results of acute toxicity test showed that under water temperature (25 ± 1) °C, pH (8.1 ± 0.1), dissolved oxygen (6.5 ± 0.5) mg/L, the higher the concentration of water ammonia nitrogen, the higher the motality of loach; 96 h LC₅₀ of total ammonia concentration (TAN) and nonionic ammonia (NH₄⁺-N) were respectively 164.4 mg/L and 2.22 mg/L. Results of the stress test showed that with the ammonia-N concentration increased, loach gills appeared different levels of injuries after 21 d. In 50 mg/L and 150 mg/L groups, the gills of loach appeared secretions and cells edema. In 250 mg/L group, secretion on surface of gill filaments increased, gill lamellae gathered together and edema of epithelia cells was sharpen. In 450 mg/L group, there was cell necrosis of gills. The ultrastructure of loach liver cell under different concentrations of ammonia nitrogen appeared varying degrees of damage. In 50 mg/L and 150 mg/L groups, mitochondria distorted, and nuclei deformed with nuclear membrane swelling. In 250 mg/L group, liver cell structure was badly damaged, and there was cytoplasm vacuolization and incomplete structure of the organelles. In 450 mg/L group, massive liver cells appeared apoptosis. With ammonia-N concentration increased, the damage in gill tissue and liver cells seemed gradually serious, and the damage was irreversible.

Key words: *Misgurnus anguillicaudatus*; ammonia-N stress; liver; gill; ultrastructure