

史东杰,朱 华,张 欣,等. 氨氮对锦鲤相关酶活性和基因表达的影响[J]. 江苏农业科学,2019,47(3):150–153.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2019.03.038

氨氮对锦鲤相关酶活性和基因表达的影响

史东杰^{1,2,3}, 朱 华^{1,2,3}, 张 欣^{1,2,3}, 王文峰⁴, 孙砚胜^{1,2,3}

[1. 北京市水产科学研究所暨国家淡水渔业工程技术研究中心, 北京 100068; 2. 农业部都市农业(北方)重点实验室, 北京 100097;
3. 渔业生物技术北京市重点实验室, 北京 100097; 4. 北京市房山区养殖业服务中心, 北京 100081]

摘要:以初始体质量约为(132.4 ± 4.6) g 的锦鲤为对象,研究不同氨氮浓度对锦鲤肝脏超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、乙酰胆碱酯酶(AChE)活性与抗氧化酶基因(*AchE*、*Cyp450*)、皮肤体色基因(*Tyr*、*Mc1r*)表达的影响。结果表明,氨氮对锦鲤在 24、48、72、96 h 的半致死浓度(LC₅₀)分别为 51.34、42.53、31.18、27.29 mg/L,安全浓度为 2.73 mg/L。氨氮暴露初期(2 d),各试验组总 SOD 活性无显著差异,暴露中后期(6、10、14 d),各试验组总 SOD 活性整体上表现出先升高后降低的趋势;在氨氮胁迫下,各试验组 CAT、AChE 活性分别大致呈现先增加后降低、一直降低的趋势;锦鲤肝脏组织中 *AchE* 基因表达量与对照相比显著下降($P < 0.05$);*Cyp450* 基因在暴露初期(2 d)和中期(6 d)无明显变化,而在暴露中后期(10、14 d)表达量明显下调($P < 0.05$);皮肤体色基因 *Tyr*、*Mc1r* 的表达量在氨氮暴露后均明显受到抑制。可以得出,随着氨氮暴露浓度的增加和暴露时间的延长,锦鲤免疫酶活性和基因表达量均趋于降低,说明鱼体免疫防御系统遭到了损伤。

关键词:氨氮;锦鲤;急性毒性;基因

中图分类号: S917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2019)03–0150–04

氨氮是水产养殖中水质检测的重要指标之一,氨氮含量对水生动物的生长有很大的影响。尤其是现代水资源紧缺,集约化养殖积累了大量排泄废物、残余饵料,还有水生动物尸体,这些物质经过异养型细菌分解为蛋白质和核酸,从而产生大量含氮有害物质^[1–2]。在水产养殖过程中,氮以分子态氮(N₂)、无机态氮(NH₃、NH₄⁺)及有机物等形式存在,其中以无机态氮(NH₃、NH₄⁺)对养殖的危害最大,毒性最强^[3]。鱼类对氨氮毒性非常敏感,氨氮可降低鱼类生长速度,伤害鱼体组织结构、免疫功能、繁殖能力以及血液生化指标^[4–6]。有学者认为,任何可以检测出的氨氮对鱼类的生长都会产生危害^[7]。

锦鲤是经济合作与发展组织(OECD)规定的 5 种试验生物之一,也是我国主养的观赏鱼类。已有研究大多集中在氨氮对鱼类的生长和酶活性的影响方面,很少有对鱼类相关基因表达的影响研究^[8–10]。本研究以锦鲤为试验对象,以抗氧化酶和基因表达量变化为指标,同时研究氨氮暴露下对锦鲤相关体色基因表达的影响,研究氨氮对锦鲤的急性毒性作用,为氨氮生态风险评估提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验锦鲤,购于北京市十里河花鸟鱼虫市场。试验鱼平均体长(12.7 ± 2.8) cm,平均体质量(132.4 ± 4.6) g,雌雄均有,鱼体健康,规格相似。暴露试验前,将试验鱼驯化 10 d,水温(25 ± 1) °C,采用曝气自来水,每天光照 8 ~ 10 h,每天定时投喂颗粒饲料 1 次,投喂总量为鱼体质量的 2% ~ 3%。养殖过程中及时换水并清除残饵和代谢废物。试验鱼自然死亡率 < 1%,试验前 24 h 禁食。

氨氮储备液:称取氯化铵(分析纯)用纯净水稀释制成 10 g/L 的储备液,备用。

1.2 试验方法

试验于 2017 年 1 月在北京市水产科学研究所小汤山良种繁育中心进行。

急性毒性试验参照文献[11]。

慢性毒性试验:在 96 h LC₅₀ 半致死浓度下,设置 8 个处理浓度,分别为 A(0.1 × LC₅₀)、B(0.2 × LC₅₀)、C(0.3 × LC₅₀)、D(0.4 × LC₅₀)、E(0.5 × LC₅₀)、F(0.6 × LC₅₀)、G(0.7 × LC₅₀)、H(0.8 × LC₅₀),并以曝气纯净水为空白对照组。每个处理浓度设置 3 个平行,每缸 25 尾鱼,水量 100 L。每天全部换水 1 次,每天投喂 2 次,投喂总量为鱼体质量的 2% ~ 3%,进行慢性毒性试验。每个质量浓度组和对照组在放鱼后的 2、6、10、14 d 分别取样,用于抗氧化酶活性和基因表达的测定。

抗氧化酶活性测定:每个处理组取 5 尾鱼,冰面解剖取肝脏组织,用磷酸缓冲盐溶液(PBS)充分匀浆,4 °C 冷冻离心(12 000 r/min)20 min 后取上清液,用于测定总超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、乙酰胆碱酯酶(AChE)活性。酶活性的测定采用南京建成生物工程研究所的试剂盒。

收稿日期:2017–09–08

基金项目:观赏鱼产业技术体系北京市创新团队建设专项资金(编号:BAIC0320170201);北京市水产科学研究所自立项目(硬头鲢及观赏鱼品种选育技术及繁殖关键技术研究与应用的研究)。
作者简介:史东杰(1985—),女,北京人,硕士,副研究员,主要从事观赏鱼繁育及养殖技术的研究工作。Tel:(010)61786845;E-mail:sdj19850104@163.com。

通信作者:朱 华,博士,研究员,主要从事水产繁殖、养殖以及水产养殖环境水质调控方面的研究与推广工作。Tel:(010)67586845;E-mail:Zhuhua@bjfishery.com。

抗氧化酶基因和体色基因表达量的测定:每个处理组取 5 尾鱼,冰面解剖取肝脏、皮肤,液氮速冻,用 TRIzol 法提取总 RNA,用 cDNA 合成试剂盒 (TaKaRa) 将定量的 RNA 反转合成 cDNA,以 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR,其间收集

荧光信号。抗氧化酶基因 cDNA 片段扩增反应条件:94 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s,60 ℃ 20 s,72 ℃ 20 s,32 个循环。体色基因 cDNA 片段扩增反应条件:95 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,36 个循环。所有基因序列来自 GenBank,引物信息见表 1。

表 1 实时荧光定量所用引物序列

目标基因	名称	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)
抗氧化酶基因	β -Actin	F:TGCGGAAACTGGCAAAGG;R:GAGGAGGGAAAGTGTAACG	116
	AchE	F:TTCGTGTCTCTGTGGAACCG;R:GCTCTGCTTGCTGTAATGG	154
	Cyp450	F:CGAAAATCCCAGACGGGCTAC;R:CCCTCATTACTGATGTGCTCCTCT	164
体色基因	β -Actin	F:CGTGATGGACTCTGCTGA;R:ACACTGTTGGCATACAGGT	478
	Tyr	F:CACGGTCTCTGATCTTCCC;R:CGTCACGCCAGTCCCAGTA	612
	Mclr	F:GCTAGTCAGCGTCAGTAAT;R:GCGAGTTGCAGATGATAAGTA	696

1.3 统计分析

试验数据用“平均值±标准差”表示。采用 SPSS 13.0 软件进行数据统计和分析,用多重比较法进行组间差异显著性分析, $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 氨氮对锦鲤的急性毒性效应

通过急性毒性试验,在高氨氮暴露下,锦鲤反应迟钝,游动迟缓,鱼鳍和尾部有不同程度的腐烂,鳃部红肿且黏液增多。由表 2 可知,总氨氮对锦鲤在 24、48、72、96 h 的半致死浓度(LC₅₀)分别为 51.34、42.53、31.18、27.29 mg/L,安全浓度为 2.73 mg/L。

2.2 氨氮对锦鲤肝脏抗氧化酶和乙酰胆碱酯酶活性的影响

表 2 氨氮对锦鲤的半致死浓度

时间(h)	回归方程	LC ₅₀ (mg/L)
24	$y=0.003x-0.136(r^2=0.772)$	51.34
48	$y=0.004x-0.121(r^2=0.824)$	42.53
72	$y=0.004x-0.109(r^2=0.862)$	31.18
96	$y=0.005x-0.101(r^2=0.889)$	27.29

注: x 为浓度的对数, y 为死亡概率。

由表 3 可知,锦鲤暴露于氨氮初期(2 d),各试验组总 SOD 活性与对照组无显著差异,暴露中后期(6、10、14 d),各试验组总 SOD 活性存在显著差异($P<0.05$),与对照组相比,A 至 E 组总 SOD 活性显著增加,而高浓度组 F 至 H 组总 SOD 活性显著降低($P<0.05$)。锦鲤暴露于氨氮初期、中期

表 3 氨氮对锦鲤肝脏总 SOD、CAT、AChE 活性的影响

酶	试验组	不同暴露时间的酶活性(U/mg)			
		2 d	6 d	10 d	14 d
SOD	对照	52.18±6.17a	52.39±6.15a	52.46±5.16a	52.19±5.23a
	A	54.16±5.07a	61.52±5.49b	68.15±4.36b	61.14±3.26b
	B	51.24±6.24a	62.14±4.39b	68.89±3.55b	65.51±4.39b
	C	53.11±5.12a	68.13±5.62b	71.55±4.61c	73.54±6.79c
	D	54.46±5.28a	69.45±4.91b	73.45±3.28c	78.11±7.14c
	E	52.18±5.89a	71.23±7.24c	75.21±6.84c	78.34±5.64c
	F	53.46±5.94a	48.51±6.18d	48.66±4.61e	42.14±4.52d
	G	54.11±6.03a	40.11±5.94e	42.13±3.47f	35.33±3.14e
	H	52.17±3.58a	42.31±4.61e	39.46±5.21g	31.24±3.27f
CAT	对照	0.89±0.12a	0.87±0.15a	0.88±0.11a	0.87±0.16a
	A	0.95±0.05b	1.13±0.22b	1.21±0.16b	0.75±0.02b
	B	0.98±0.11b	0.95±0.18c	0.98±0.22c	0.68±0.12c
	C	1.12±0.08c	1.15±0.05b	1.14±0.23b	0.71±0.14b
	D	0.91±0.02b	1.21±0.02b	1.25±0.04b	0.70±0.22b
	E	1.28±0.12c	1.33±0.21d	1.29±0.13b	0.65±0.15c
	F	1.35±0.13d	1.21±0.13b	1.20±0.24b	0.64±0.14c
	G	1.08±0.14c	1.36±0.11d	1.33±0.03c	0.66±0.12c
	H	1.09±0.21c	1.16±0.14b	1.18±0.31b	0.49±0.23d
AChE	对照	9.83±0.23a	9.81±0.14a	9.90±0.20a	9.83±0.25a
	A	9.21±0.12b	9.11±0.13b	8.87±0.17b	8.01±0.16b
	B	9.15±0.25b	8.79±0.12c	8.23±0.16b	7.78±0.14c
	C	8.89±0.28c	8.02±0.21c	7.45±0.13c	7.13±0.12c
	D	8.63±0.25c	7.78±0.09d	7.12±0.18c	6.78±0.09d
	E	8.51±0.29c	7.54±0.14d	6.98±0.11d	6.15±0.11d
	F	8.64±0.24c	7.13±0.15d	6.45±0.09d	6.02±0.13d
	G	8.55±0.18c	7.10±0.12d	6.13±0.14d	5.89±0.12e
	H	8.46±0.26c	6.98±0.21e	5.41±0.09e	4.23±0.05f

注:同列数据后标有不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下表同。

(2、6、10 d),各试验组 CAT 活性与对照组相比显著增加($P<0.05$);暴露后期(14 d),各试验组 CAT 活性与对照组相比显著降低($P<0.05$)。锦鲤暴露于氨氮初期、中期和后期(2、6、10、14 d),锦鲤肝脏 AChE 活性均受到显著限制,且随着暴露时间、浓度的增加,AChE 活性明显降低。

2.3 氨氮对锦鲤相关基因表达的影响

氨氮对锦鲤肝脏抗氧化酶基因 *AchE*、*Cyp450* 和皮肤体色基因 *Tyr*、*Mc1r* 表达量的影响见表 4,可以看出,氨氮暴露后,

锦鲤肝脏组织中 *AchE* 基因表达比率与对照组相比,受到显著限制($P<0.05$),且随着暴露时间的增加,氨氮处理浓度的提高,*AChE* 基因表达量显著下降($P<0.05$),与酶活性测定结果基本一致。*Cyp450* 基因在暴露初期(2 d)和中期(6 d)无明显变化,而在暴露中后期(10、14 d)表达量显著下调($P<0.05$),说明受到了抑制。由表 4 可知,皮肤体色基因 *Tyr*、*Mc1r* 的表达量在氨氮暴露后均明显受到抑制。

表 4 氨氮对锦鲤基因 mRNA 表达比率的影响

基因	试验组	不同暴露时间的 mRNA 表达比率			
		2 d	6 d	10 d	14 d
<i>AchE</i>	对照	2.11 ± 0.02a	2.30 ± 0.09a	2.18 ± 0.13a	2.21 ± 0.05a
	A	1.81 ± 0.04b	1.61 ± 0.06b	1.51 ± 0.09b	1.31 ± 0.04b
	B	1.72 ± 0.02b	1.42 ± 0.04b	1.42 ± 0.08b	1.22 ± 0.03b
	C	1.69 ± 0.03b	1.25 ± 0.07c	1.33 ± 0.06c	0.85 ± 0.07c
	D	1.35 ± 0.05c	1.13 ± 0.09c	1.33 ± 0.05c	0.81 ± 0.04c
	E	1.22 ± 0.04c	1.01 ± 0.05c	1.28 ± 0.07c	0.69 ± 0.01e
	F	1.03 ± 0.05c	0.98 ± 0.06d	1.15 ± 0.08d	0.55 ± 0.01f
	G	0.81 ± 0.06d	0.89 ± 0.05d	1.09 ± 0.04d	0.46 ± 0.04e
	H	0.79 ± 0.02d	0.78 ± 0.07d	0.70 ± 0.03e	0.39 ± 0.02g
<i>Cyp450</i>	对照	1.52 ± 0.08a	1.49 ± 0.07a	1.53 ± 0.07a	1.51 ± 0.03a
	A	1.51 ± 0.09a	1.53 ± 0.08a	1.33 ± 0.08b	1.21 ± 0.05b
	B	1.48 ± 0.01a	1.55 ± 0.06a	1.25 ± 0.01c	1.01 ± 0.07c
	C	1.50 ± 0.07a	1.49 ± 0.09a	1.36 ± 0.03b	0.97 ± 0.06c
	D	1.48 ± 0.09a	1.46 ± 0.01a	1.04 ± 0.04e	0.95 ± 0.07c
	E	1.46 ± 0.04a	1.50 ± 0.05a	1.22 ± 0.04b	0.99 ± 0.08c
	F	1.51 ± 0.03a	1.46 ± 0.06a	1.13 ± 0.06e	0.71 ± 0.02e
	G	1.52 ± 0.04a	1.47 ± 0.06a	1.15 ± 0.05e	0.60 ± 0.04f
	H	1.49 ± 0.09a	1.46 ± 0.07a	0.98 ± 0.07e	0.51 ± 0.04g
<i>Tyr</i>	对照	6.55 ± 0.24a	6.45 ± 0.27a	6.54 ± 0.21a	6.49 ± 0.12a
	A	6.41 ± 0.27a	5.81 ± 0.21b	5.91 ± 0.12b	5.84 ± 0.04b
	B	5.81 ± 0.21b	5.52 ± 0.16b	5.82 ± 0.15b	5.65 ± 0.06b
	C	5.92 ± 0.25b	5.41 ± 0.15b	5.65 ± 0.13b	4.38 ± 0.03c
	D	5.25 ± 0.16c	5.16 ± 0.11c	5.39 ± 0.08c	4.36 ± 0.11c
	E	5.16 ± 0.12c	4.92 ± 0.08c	5.40 ± 0.07c	3.37 ± 0.07c
	F	4.41 ± 0.10d	4.61 ± 0.05d	4.41 ± 0.06c	3.85 ± 0.09d
	G	4.38 ± 0.09d	4.59 ± 0.04d	4.29 ± 0.09d	3.86 ± 0.08d
	H	4.34 ± 0.07d	3.92 ± 0.01e	3.54 ± 0.06e	3.80 ± 0.04d
<i>Mc1r</i>	对照	8.73 ± 0.23a	8.75 ± 0.21a	8.74 ± 0.19a	8.69 ± 0.23a
	A	7.94 ± 0.21b	7.81 ± 0.23b	6.65 ± 0.17b	6.51 ± 0.19b
	B	7.57 ± 0.18b	7.59 ± 0.12b	6.58 ± 0.15b	6.42 ± 0.12b
	C	7.25 ± 0.19b	7.13 ± 0.19c	6.21 ± 0.15c	6.10 ± 0.09c
	D	7.32 ± 0.25b	7.41 ± 0.16b	5.91 ± 0.08d	5.71 ± 0.07d
	E	7.11 ± 0.21b	6.81 ± 0.13d	5.88 ± 0.12d	5.69 ± 0.05d
	F	6.91 ± 0.24c	6.20 ± 0.10e	5.44 ± 0.03e	5.59 ± 0.06d
	G	6.23 ± 0.12d	6.18 ± 0.09e	5.13 ± 0.08f	4.81 ± 0.04e
	H	6.19 ± 0.16d	5.91 ± 0.08f	4.51 ± 0.05g	3.92 ± 0.03f

3 讨论

氨氮是水产养殖环境中的一种重要环境污染因子,氨氮的危害可表现为大量消耗水体溶解氧而使水中缺氧并与氯作用生成氯胺,从而增加氧的消耗量,影响鱼鳃的氧传递,浓度较高时导致鱼类死亡,同时高浓度的氨氮还有可能形成亚硝酸,可致癌、致变异和致畸,对鱼体有潜在威胁,可加速水体富营养化过程^[12]。氨氮对水生生物的危害主要表现为非离子氨

的危害,非离子氨进入生物体内,会对酶水解反应造成破坏。许多研究表明,高浓度氨氮胁迫对水生生物的免疫具有显著的影响,尤其是长时间高浓度胁迫会导致机体免疫力下降。例如斑马鱼^[13]、罗非鱼^[9]、黄颡鱼^[14]等鱼类的死亡率随着氨氮浓度的升高和时间的延长不断提高,这与本试验结果一致。由本试验可知,毒性效应与氨氮浓度和胁迫时间呈正相关。在本试验中,氨氮对锦鲤 24、48、72、96 h 的半致死浓度(LC₅₀)分别为 51.34、42.53、31.18、27.29 mg/L,安全浓度为 2.73 mg/L。

超氧化物歧化酶是机体重要的抗氧化酶,它是生物体有效清除活性氧、防止活性氧合成和蓄积、阻断脂质过氧化连锁反应、保护细胞膜免受损伤的重要酶类之一,可反映机体免疫能力,被称为生物体抗氧化系统的第一道防线^[15]。过氧化氢酶是生物体内抗氧化系统中重要的保护酶,起着催化 H_2O_2 分解、保护生物体组织免受毒害的重要作用。周莹等研究氨氮对斑马鱼肝脏组织 SOD 活性的影响发现,氨氮胁迫后表现为低浓度促进、高浓度抑制的趋势^[13]。从本试验结果可知,锦鲤受到氨氮胁迫的过程中,肝脏组织 SOD 和 CAT 活性在下降之前都有不同浓度、不同时间的上升规律,这与氨氮胁迫下斑马鱼的反应相似。分析其原因可能是当水体中氨氮浓度较高时,机体在不同浓度、不同时间氨氮作用下,机体生物免疫力增高,即产生了“毒性兴奋效应”,而在本试验后期(10、14 d)时,随着时间的延长,锦鲤体内氨氮积累了较高的毒性,体内自由基防卫系统受到破坏,促使过氧化氢、单线态氧等浓度增加,导致酶活性迅速下降,机体免疫失衡,因此 SOD 和 CAT 活性显著下降。在本试验中的不同胁迫浓度、不同胁迫时间处理下,AChE 活性均受到抑制,这和周莹等报道的氨氮浓度抑制斑马鱼 AChE 活性^[13]一致。说明氨氮浓度的增加可迅速降低 AChE 活性,从而使机体免疫失衡。

生物机体在受到外界刺激后,在不同水平(蛋白、基因、细胞、组织器官)上均会发生不同程度的应激反应,从而减轻或者适应污染物的压力^[16]。近年来,许多研究表明,污染物对基因表达水平的影响程度可以用来监控其毒性。Wirzinger 等认为,分子水平(DNA 或 RNA)的指示物具有清晰、明确、特异性更强的特点,且避免了后续翻译与修饰过程中的干扰^[17]。王丽等研究高效氯氰菊酯急性暴露中斑马鱼相关酶活性和基因表达变化的影响时发现,高效氯氰菊酯会抑制斑马鱼肝脏、肠和脑中 AChE 和 CYP450 的 mRNA 表达量^[18]。Wu 等的研究发现,斑马鱼胚胎暴露于一定浓度四溴双酚 A(TBBPA)时,Cu/Zn-SOD、CAT 的 mRNA 表达下调^[19]。在本研究中,于氨氮中暴露后,锦鲤肝脏组织中 AChE 基因表达与对照组相比受到显著性限制,且随着暴露时间的增加,氨氮处理浓度的提高,AChE 基因表达量显著下降,与酶活性测定结果基本一致。Cyp450 基因在暴露初期(2 d)和中期(6 d)无明显变化,而在暴露中后期(10、14 d)表达量明显下调,这一结果与 Wu 等的研究结果类似^[19]。这说明在高浓度氨氮暴露下,锦鲤氧化损伤严重,在短时间内即可造成机体免疫失衡,产生较大的毒害作用。在本试验中,皮肤体色基因 *Tyr*、*Mc1r* 的表达量在氨氮暴露后均明显受到抑制,试验期间试验鱼体色无光泽、暗淡,也说明氨氮可显著影响锦鲤体色。

综上所述,本研究获得了氨氮对锦鲤的急性毒性结果和氨氮胁迫下抗氧化基因、皮肤体色基因转录量的变化规律,发现氨氮对锦鲤免疫系统和体色因子有重要的损伤。综合考虑,建议锦鲤养殖过程中氨氮浓度应不高于 1.6 mg/L。

参考文献:

- [1] Camargo J A, Alonso A. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment [J]. *Environment International*, 2006, 32(6): 831–849.
- [2] Ackerman P A, Wicks B J, Iwama G K, et al. Low levels of

- environmental ammonia increase susceptibility to disease in Chinook salmon smolts [J]. *Physiological and Biochemical Zoology*, 2006, 79(4): 695–707.
- [3] 武雪萍, 蔡典雄, 梅旭荣, 等. 黄河流域农业水资源与水环境问题及技术对策 [J]. *生态环境*, 2007, 16(1): 248–252.
- [4] Sung Y Y, Macrae T H, Sorgeloos P, et al. Stress response for disease control in aquaculture [J]. *Reviews in Aquaculture*, 2011, 3(3): 120–137.
- [5] Atwood H L, Tomasso J R, Ronan P J, et al. Brain mono-amine concentrations as predictors of growth inhibition in Channel catfish exposed to ammonia [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2000, 12(1): 69–73.
- [6] McKenzie D J, Shingles A, Taylor E W. Sub-lethal plasma ammonia accumulation and the exercise performance of salmonids [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology A – Molecular & Integrative Physiology*, 2003, 135(4): 515–526.
- [7] Colt J, Tchobanoglous G. Chronic exposure of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, to ammonia: effects on growth and survival [J]. *Aquaculture*, 1978, 15: 353–372.
- [8] 陈家长, 简纪常, 胡庚东, 等. 水体中 $\text{NH}_3\text{-N}$ 对建鲤非特异性免疫功能的影响 [J]. *湛江海洋大学学报*, 2000, 20(3): 13–16.
- [9] 强俊, 徐跑, 何杰, 等. 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 [J]. *水产学报*, 2011, 35(12): 1837–1848.
- [10] 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(3/4): 400–406.
- [11] 水质物质对淡水鱼(斑马鱼)急性毒性测定方法: GB/T 13267—1991 [S]. 1991.
- [12] 陈坚. 环境生物技术 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 55–58.
- [13] 周莹, 孙梨宗, 刘志红, 等. 氨氮对斑马鱼 3 种酶活性和基因表达的影响 [J]. *沈阳师范大学学报(自然科学版)*, 2016(1): 88–91.
- [14] 黎庆, 龚诗雁, 黎明. 慢性氨氮暴露诱发黄颡鱼幼鱼谷氨酰胺积累、氧化损伤及免疫抑制的研究 [J]. *水产学报*, 2015, 39(5): 728–734.
- [15] Willima M F, Kazina S B. Localization of superoxide dismutase activity in rat tissues [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 1997, 22(1/2): 241–248.
- [16] 蔡中华, 陈艳萍, 周进, 等. 生物标志物(Biomarkers)在海洋环境监测中的研究与进展 [J]. *生命科学*, 2012, 24(9): 1035–1048.
- [17] Wirzinger G, Weltje L, Gercken J, et al. Genotoxic damage in field-collected three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.): a suitable biomonitoring tool? [J]. *Mutation Research*, 2007, 628(1): 19–30.
- [18] 王丽, 张耘泽, 耿歌, 等. 高效氯氰菊酯急性暴露中斑马鱼相关酶活性和基因表达变化 [J]. *生态毒理学报*, 2016, 11(4): 146–154.
- [19] Wu S M, Ji G X, Liu J N, et al. TBBPA induces developmental toxicity, oxidative stress, and apoptosis in embryos and zebrafish larvae (*Danio rerio*) [J]. *Environmental Toxicology*, 2016, 31(10): 1241–1249.