

DOI: 10.3969/j.issn.1000-7083.2012.02.017

# 硝酸铵影响红耳龟和中华条颈龟孵化及血液生理指标的研究

傅丽容, 贺斌, 王雪, 史海涛\*

(海南师范大学生命科学学院 海口 571158)

**摘要:** 研究孵化基质中硝酸铵胁迫对红耳龟 *Trachemys scripta elegans* 和中华条颈龟 *Mauremys sinensis* 孵化及稚龟血液生理指标的影响。采用不同浓度硝酸铵 (0 mg/L, 0.01 mg/L, 0.1 mg/L) 处理基质, 在 (30 ± 0.5) °C 下对两种龟卵进行孵化。结果表明: 红耳龟的孵化率显著高于中华条颈龟 ( $P < 0.05$ ), 血细胞数量和形态变化明显。0.1 mg/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  处理组红细胞数和白细胞数分别为  $(9.68 \pm 2.91) \times 10^{11}$  个/L 和  $(1.11 \pm 0.18) \times 10^{10}$  个/L, 显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 红细胞长短径比  $(1.71 \pm 0.14)$  与对照组和 0.01 mg/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  处理组差异显著 ( $P < 0.05$ ); 中华条颈龟血细胞数量和形态在各个处理组间未见显著差异。对比研究各项指标可知, 红耳龟可以通过增加血细胞数量和改变红细胞形态提高免疫力对抗硝酸铵胁迫, 提示对环境的适应性强于中华条颈龟。

**关键词:** 硝酸铵; 红耳龟; 中华条颈龟; 血细胞

中图分类号: Q959.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-7083(2012)02-0252-04

## Effects of Ammonium Nitrate Fertilizer on Incubation and Blood Physiological Indices of *Trachemys scripta elegans* and *Mauremys sinensis*

FU Li-rong, HE Bin, WANG Xue, SHI Hai-tao\*

(1. College of Life Sciences, Hainan Normal University, Haikou 571158, China)

**Abstract:** In order to compare the stress response of baby *Trachemys scripta elegans* and *Mauremys sinensis*, we treated the substrate in which their eggs hatched with three different concentrations (0 mg/L, 0.01 mg/L, and 0.1 mg/L) of ammonium nitrate ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ). After hatching, the data of hatchability and various physiological parameters of blood were collected from these offspring. All eggs were incubated at  $30^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ . The results indicate that the hatching rate of *T. scripta elegans* was significant higher than that of *M. sinensis* ( $P < 0.05$ ). Accordingly, the blood parameters show different performance of the two species to the stressed environment. In *T. scripta elegans*, animals in group treated with 0.1 mg/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  were tested to possess more red and white blood cells ( $(9.68 \pm 2.91) \times 10^{11}$  cells/L and  $(1.11 \pm 0.18) \times 10^{10}$  cells/L respectively) than the control group ( $P < 0.05$ ). Moreover, the ratio of long and short diameter of red cell ( $1.71 \pm 0.14$ ) is significantly higher than the other two groups ( $P < 0.05$ ). However, there is no significant difference between treatments in all of these parameter of *M. sinensis*. Hence, we could suggest that *T. scripta elegans* probably can improve its immunity by increasing the number of haemocyte and changing the morphology of red blood cell in respond to the stress of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . In addition, our results could explain why *T. scripta elegans* is more adaptive than *M. sinensis* to some degree.

**Key words:** ammonium nitrate; *Trachemys scripta elegans*; *Mauremys sinensis*; blood corpuscle

氮肥的大量使用给生态环境带来严重的污染,也给动物的生理机能和生存带来很大的威胁(吕殿青等, 1998; 孙文涛等, 2000)。胚胎发育是动物生活史中的重要时期,也是对生态因子最敏感的时期,氮氨胁迫会影响动物的生长发育(Schuytema & Nebeker, 1999; Lemarié *et al.*, 2004)和免疫功能(Cheng *et al.*, 2003, 2004),在污染胁迫严重的情况

下,胚胎的畸形率显著上升(Klumpp *et al.*, 2002)。Marco(2004)等研究硝酸铵对蜥蜴卵孵化的影响,认为通过影响血液携氧量进而影响胚胎的发育,使蜥蜴卵孵化成功率降低,孵化周期明显延长。血液作为衡量动物体对环境适应状况、健康以及营养状况的最重要指标之一(Dalmo *et al.*, 1997; 王军萍, 2001),研究报道水体中亚硝酸盐或氨氮含量过高均

收稿日期: 2011-08-19 接受日期: 2011-09-14

基金项目: 国际地区重大合作项目(30910103916); 海南省自然科学基金资助项目(310040); 海南省教育厅资助项目(Hjkj2010-24)

作者简介: 傅丽容(1964~),女,副教授,从事动物生理学研究, E-mail: flr@hainnu.edu.cn

\* 通讯作者 Corresponding author 教授 E-mail: haitao-shi@263.net

可引起血细胞数量减少(孙彭力,王慧君,1995; Das *et al.*, 2004; 王琨, 2007) 血细胞超微结构发生病理性变化(栗方亮,章家恩,2007)。环境胁迫通过引起机体的一系列病理变化,如组织损伤、红细胞形态发生变化、吞噬细胞数量增加、白细胞减少等,进而影响机体的防御系统影响生长发育(席峰,2001)。

红耳龟 *Trachemys scripta elegans* 是 IUCN 公布的全球 100 种最具威胁的外来物种之一(史海涛等, 2009)。它食性杂 栖息环境多样 繁殖、竞争和耐受能力强。中华条颈龟 *Mauremys sinensis* 属于本地种,与红耳龟具有相同的生态位,在野外也有红耳龟与本土中华条颈龟存在于同一生境的情况(Chen & Luo, 1998)。繁育后代时亲体无护卵行为,长达数月的卵孵化在土壤中进行,环境胁迫是否会影响龟鳖类动物卵的孵化,红耳龟与我国本土龟类对抗环境胁迫能力是否存在差异均未见研究报道。因此本研究模拟硝酸铵胁迫孵化红耳龟和中华条颈龟卵,以了解红耳龟和中华条颈龟对环境的适应性,为探讨红耳龟入侵机制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用中华条颈龟卵和红耳龟受精卵(已受精 2~3 d),于 2009 年 3 月 3 日购自海南文昌龟鳖养殖场,每种龟卵各 60 枚。胚盘明显、发育正常。

### 1.2 人工孵化

配制 0 mg/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (对照组)、0.01 mg/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (低浓度组)、0.1 mg/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (高浓度组)三种浓度的蛭石作为孵化基质,在孵化箱底部铺一层厚度约 5 cm 的已经调配好的蛭石,每个浓度梯度

随机放入受精卵 20 枚,覆盖 2~3 cm 蛭石,孵化箱放入恒温恒湿培养箱,设置孵化箱温度( $30 \pm 0.5$ ) $^{\circ}\text{C}$ 。在孵化箱蛭石 2 cm 处插入水银温度计,以此温度计为准控制孵化温度。两种龟卵的孵化条件完全相同。

### 1.3 数据统计及血液生理指标检测

记录每只卵的孵化时间,统计不同硝酸铵处理胚胎发育的时间及孵化成活率,孵出 24 h 后进行血液生理指标的检测,包括血细胞计数和常规血涂片制作。使用 SPSS 软件完成以上所得数据的统计,(1) Kruskal-Wallis 多独立样本非参数检验和  $\chi^2$ -检验 检验不同浓度硝酸铵对胚胎孵化率的影响和血细胞数量变化;(2) 方差分析(ANOVA) 结合 LSD 法 检验不同硝酸铵浓度对胚胎孵化期的影响和血细胞形态变化。

## 2 结果

### 2.1 基质硝酸铵对胚胎发育及孵化成活率的影响

在孵化基质含有不同硝酸铵的条件下统计胚胎发育的速率及成活率(表 1)。经 Kruskal-Wallis 多独立样本非参数检验,两种龟卵在不同浓度硝酸铵基质环境下,孵化率无显著差异( $\chi^2 = 0.233, P > 0.05$ ;  $\chi^2 = 4.421, P > 0.05$ );相同的高浓度硝酸铵处理下,红耳龟的孵化率显著高于中华条颈龟的孵化率( $\chi^2 = 3.960, P < 0.05$ ),在蒸馏水和低浓度硝酸铵处理下则无显著差异( $\chi^2 = 0.037, P > 0.05$ ;  $\chi^2 = 0.013, P > 0.05$ ),说明低浓度硝酸铵对胚胎发育影响不大。使用方差分析-LSD 检验,证明两种龟实验组与对照组孵化期均无显著影响( $F = 0.337, P > 0.05$ ;  $F = 1.335, P > 0.05$ )。

表 1 不同硝酸铵处理两种龟的胚胎发育速率及成活率

Table 1 The survival rate and developmental rate of two species treated by different ammonium nitrate concentration

分组 Grouping		孵卵数 Total of eggs	孵出稚龟 Hatchings( No. )	孵化成活率 Incubation survival rate( % )	孵化时间 Incubation time( d )	发育速率 Development rate
蒸馏水 Distilled water	红耳龟	18	16	88.89 <sup>a</sup>	53.27 ± 1.74	0.019
	中华条颈	20	17	85.00 <sup>a</sup>	49.64 ± 0.67	0.020
0.01 mg/L $\text{NH}_4\text{NO}_3$	红耳龟	18	15	83.33 <sup>a</sup>	53.00 ± 1.76	0.019
	中华条颈龟	19	15	78.94 <sup>a</sup>	50.73 ± 1.35	0.020
0.1 mg/L $\text{NH}_4\text{NO}_3$	红耳龟	18	16	88.89 <sup>a</sup>	53.00 ± 1.32	0.019
	中华条颈龟	20	9	45.00 <sup>b</sup>	50.00 ± 1.32	0.020

注:同一列字母角标相同的为差异不显著,不同为差异显著( $P < 0.05$ )

Note: The same letter subscripted of the same column is no-significant, otherwise is different significantly ( $P < 0.05$ )

### 2.2 基质硝酸铵对孵化稚龟血细胞形态的影响

测量两种稚龟红细胞长短径比,比较不同硝酸铵处理红细胞形态的变化,结果如表 2。

单因素方差分析表明,不同硝酸铵处理红耳龟稚龟红细胞形态表现出明显的差异显著性( $\chi^2 = 4.24, df = 1, P < 0.05$ )。高浓度组红细胞长短比为

表 2 不同浓度硝酸铵处理两种稚龟红细胞长短径比  
Table 2 The ratio of long and short diameter of two species treated by different ammonium nitrate concentration

参数 Parameters	红耳龟 (n=10)			中华条颈龟 (n=8)		
	对照 Control	0.01 mg/L NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.1 mg/L NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	对照 Control	0.01 mg/L NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.1 mg/L NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
长径 (μm) Long diamete	17.26 ± 1.51	16.59 ± 1.25	16.36 ± 0.91	19.08 ± 1.14	18.82 ± 0.91	18.71 ± 1.14
短径 (μm) Short diamete	10.72 ± 0.69 <sup>ab</sup>	11.25 ± 1.95 <sup>a</sup>	9.60 ± 0.60 <sup>b</sup>	10.85 ± 1.43	9.93 ± 0.56	10.11 ± 1.09
长短比	1.61 ± 0.16 <sup>b</sup>	1.50 ± 0.21 <sup>b</sup>	1.71 ± 0.14 <sup>a</sup>	1.79 ± 0.28	1.90 ± 0.10	1.87 ± 0.22

注:同一横行中相同字母表示差异不显著(P>0.05),不同字母表示差异显著(P<0.05),下同  
The same letter subscripted of the same column is no-significant(P>0.05), otherwise is different significantly(P<0.05), the same below

1.71 ± 0.14, 显著高于对照组 1.61 ± 0.16 和低浓度组 1.50 ± 0.21。对照组和低浓度组之间差异不显著,可能是由于硝酸铵浓度过低,还不足以引起红细胞形态发生变化。中华条颈龟的形态并未表现出随

硝酸铵变化的趋势。

2.3 基质硝酸铵对孵化稚龟血细胞数量的影响  
统计两种稚龟血细胞数量,了解硝酸铵对血液生理指标的影响,结果如表 3。

表 3 不同浓度硝酸铵处理两种稚龟血细胞数量  
Table 3 The haemocyte count of two species treated by different ammonium nitrate concentration

细胞种类 Haemocyte	红耳龟 (n=10)			中华条颈龟 (n=8)		
	对照 Control	0.01 mg/L NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.1 mg/L NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	对照 Control	0.01 mg/L NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.1 mg/L NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
红细胞(×10 <sup>11</sup> 个/L) Erythrocyte	5.78 ± 0.78 <sup>a</sup>	6.47 ± 1.44 <sup>a</sup>	9.68 ± 2.91 <sup>b</sup>	6.29 ± 2.58	7.79 ± 2.88	8.87 ± 2.03
白细胞(×10 <sup>10</sup> 个/L)	0.71 ± 0.19 <sup>a</sup>	0.86 ± 0.15 <sup>b</sup>	1.11 ± 0.18 <sup>b</sup>	0.77 ± 0.23	0.89 ± 0.25	1.05 ± 0.30
嗜中性粒细胞(%) Heterphil	18.73 ± 8.98 <sup>a</sup>	21.83 ± 11.17 <sup>a</sup>	43.55 ± 10.31 <sup>b</sup>	30.5 ± 3.99	31.16 ± 5.42	32.55 ± 5.32
嗜酸性粒细胞(%) Eosinophi	3.20 ± 0.61 <sup>a</sup>	3.04 ± 2.25 <sup>a</sup>	1.61 ± 2.14 <sup>a</sup>	1.74 ± 1.38	1.15 ± 0.35	2.86 ± 1.98
嗜碱性粒细胞(%) Basophil	0.94 ± 0.85 <sup>a</sup>	0.87 ± 0.66 <sup>a</sup>	0.81 ± 0.91 <sup>a</sup>	0.63 ± 1.25	1.67 ± 2.83	1.35 ± 2.69
单核细胞(%) Monocyte	3.55 ± 0.95 <sup>a</sup>	3.65 ± 2.42 <sup>a</sup>	3.23 ± 0.89 <sup>a</sup>	2.58 ± 1.37	2.98 ± 2.29	2.50 ± 2.99
淋巴细胞(%) Lymphocyte	54.92 ± 12.28 <sup>a</sup>	50.63 ± 15.83 <sup>a</sup>	35.48 ± 13.71 <sup>a</sup>	48.41 ± 7.64	45.75 ± 11.48	45.48 ± 3.71
血栓细胞(%) Thrombocyte	18.34 ± 3.07 <sup>a</sup>	19.88 ± 9.57 <sup>a</sup>	14.92 ± 3.95 <sup>a</sup>	15.80 ± 1.71	17.09 ± 2.80	15.13 ± 6.78

从表 3 结果可以看出,基质硝酸铵明显影响红耳龟稚龟红、白细胞数的变化。高浓度组的红细胞数(9.68 ± 2.91) × 10<sup>11</sup>个/L 明显增加(P<0.05),低浓度组(6.47 ± 1.44) × 10<sup>11</sup>个/L 与对照组(5.78 ± 0.78) × 10<sup>11</sup>个/L 差异不显著,这与红细胞形态变化趋势相一致。低浓度组(0.86 ± 0.15) × 10<sup>10</sup>个/L 和高浓度组(1.11 ± 0.18) × 10<sup>10</sup>个/L 白细胞数均明显高于对照组(0.71 ± 0.19) × 10<sup>10</sup>个/L (P<0.05),但两处理组之间无显著性差异。中华条颈龟各组间红、白细胞数量均无显著差异。

两种稚龟白细胞数量主要表现在不同种类的白细胞所占的比例不同。血涂片观察均可见嗜中性、嗜酸性、嗜碱性、单核、淋巴和血栓 6 类白细胞,高浓度处理使红耳龟嗜中性粒细胞变化明显,高于对照

组和低浓度组(χ<sup>2</sup> = 3.26, df = 1, P < 0.05; χ<sup>2</sup> = 5.15, df = 1, P < 0.05),硝酸铵处理未引起中华条颈龟白细胞总数和各类白细胞所占比例的明显改变。

### 3 讨论

氮肥对环境的污染主要是硝酸盐,硝酸盐本身没有毒害,但进入动物体内经硝酸还原菌作用后被还原为亚硝酸盐,亚硝酸盐是强氧化剂,进入血液后扰乱氮排泄,降低氧合血红蛋白水平导致低氧血症,使各组织缺氧(孙彭力,王慧君,1995)。研究报道,在环境胁迫影响下红细胞形态和数目会发生明显改变, Das 等(2004)发现水体中亚硝酸盐含量达 1 mg/L ~ 8 mg/L 时即能引起印鲟 *Cirrhinus mrigala* 体内红细胞数量下降,血红蛋白含量渐进性减少。本实验

通过对两种孵化稚龟血液指标的检测,发现 0.1 mg/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  处理组红耳龟红细胞数量明显增加,而且红细胞长短径比增大,中华条颈龟变化不明显,可能与硝酸铵造成的环境胁迫有密切关系。适度的缺氧刺激使红耳龟脾脏造血功能旺盛,释放出大量红细胞,以加强输血机能,满足机体生理代谢对氧的需要,是一种获得缺氧代偿能力的表现(沈晓民等,1991);红细胞长短比增大可能是另一种缺氧代偿能力获得的表现(许源剑,孙敏,2010)。红耳龟能够通过自身的这种应激性升高生理调节最终适应环境的变化,在变化后的环境中再次达到新陈代谢的平衡,保持机体内环境的稳态。相同环境孵化出来的中华条颈龟未出现相应的变化,说明红耳龟对环境变化的敏感性较强。

白细胞作为主要的免疫细胞(关克复,马小彤,2010),其细胞数水平反映了机体免疫力的高低,硝酸铵处理红耳龟稚龟白细胞数均明显高于对照组,说明硝酸铵胁迫在红耳龟体内引发非特异性免疫,导致白细胞数显著升高。中华条颈龟的白细胞未出现升高现象,一方面可能是机体的免疫系统对环境胁迫造成的应激反应存在个体差异,另一方面,也可能是长时间处在应激特别是在严酷的生活条件下,可能超出个体应付应激的能力,从而导致感觉迟钝,伴随着下丘脑-垂体-肾上腺轴的变化而引起反应的变化,潜在免疫受到抑制(周显青等,2001)。这可能也是造成中华条颈龟孵化率低于红耳龟的原因之一。低浓度硝酸铵就可以使白细胞数发生变化,而对红细胞则不能。虽然人们对红细胞免疫功能的发现及深入研究在不断进行,红细胞在免疫系统中所起的作用也日益明显,但目前依然认为白细胞是主要的免疫细胞,其对外界环境的敏感性比红细胞更高,更能反映出外界环境的变化,而红细胞则成为行使免疫功能的备用成分,在环境极度恶劣时才表现数目变化(苏金旋,2005)。

通过环境胁迫试验下各项指标的综合比较,可以认为红耳龟对外界环境的变化敏感,免疫力强,比本地土著种中华条颈龟有更强的对抗环境胁迫的能力。

#### 4 参考文献

关克复,马小彤. 2010. 白细胞功能多极化及其意义[J]. 中国实验血液学杂志,18(1): 1~6.  
栗方亮,章家恩. 2007. 环境胁迫对土壤动物生态学影响研究进展[J]. 农业资源与环境科学,23(6): 542~546.  
吕殿青,同延安,孙本华. 1998. 氮肥施用对环境污染影响的研究

[J]. 植物营养与肥料学报,4(1): 8~15.  
沈晓民,董合一,华苒. 1991. 团头鲂血液指标与水环境的关系[J]. 生态学报,11(1): 93~94.  
史海涛,龚世平,梁伟,等. 2009. 控制外来物种红耳龟在中国野生环境蔓延的态势[J]. 生物学通报,44(4): 1~3.  
苏金旋. 2005. 红细胞的免疫功能及影响因素[J]. 齐齐哈尔医学院学报,26(11): 1319~1320.  
孙彭力,王慧君. 1995. 氮素化肥的环境污染[J]. 环境污染与防治,2(17): 38~41.  
孙文涛,肖干明,朱洪国,等. 2000. 试论氮肥施用对环境的影响[J]. 杂粮作物,20(1): 38~41.  
王军萍. 2001. 龟鳖类血液学研究概述[J]. 动物学杂志,36(2): 47~51.  
王琨. 2007. 氮素对鲤幼鱼部分组织和血液指标的影响[D]. 东北农业大学硕士学位论文.  
席峰. 2001. 鱼类应激及其适应性生热作用[J]. 饲料研究,10: 10~12.  
许源剑,孙敏. 2010. 环境胁迫对鱼类血液影响的研究[J]. 水产科技,(3): 27~28.  
周显青,孙儒泳,牛翠娟. 2001. 应激对水生动物生长、行为和生理活动的影响[J]. 动物学研究,22(2): 89~92.  
Chen TS, Luo KY. 1998. Ecology of the Chinese-Striped Turtle, *Ocadia sinensis*, in the Keelung River, Northern Taiwan [J]. Copeia, 4: 944~952.  
Cheng W, Chen SM, Wang FI, et al. 2003. Effects of temperature, pH, salinity and ammonia on the phagocytic activity and clearance efficiency of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* Lactococcus garvieae [J]. Aquaculture, 219(1): 111~115.  
Cheng W, Shao IS, Chen JC. 2004. Effect of ammonia on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor* supertexta and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Fish & Shellfish Immunol, (3): 193~196.  
Dalmo RA, Ingebrigtsen K, Bogwald J. 1997. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system [J]. J Fish Dis, 20: 241~273.  
Das PC, Ayyappan S, Jena JK, et al. 2004. Nitrite toxicity in *Cirrhinus mrigala* Ham: acute toxicity and sub-lethal effect on selected haematological parameters [J]. Aquaculture, 235(1-4): 633~644.  
Klumpp DW, Humphrey C, Hong HS, et al. 2002. Toxic contaminants and their biological effects in coastal waters of Xiamen, China. II. Biomarkers and embryo malformation rates as indicators of pollution stress in fish [J]. Marine Pollution Bulletin, 44: 761~769.  
Lemarié G, Dosdat A, Covès D, et al. 2004. Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles [J]. Aquaculture, 229(1): 479~482.  
Marco A, Hidalgo J, Diaz-paniagua C. 2004. Toxic Effect of Ammonium Nitrate Fertilizer on Flexible-Shelled Lizard Eggs [J]. Bull Environ Contam Toxicol, 73: 125~131.  
Schuytema GS, Nebeker AV. 1999. Comparative toxicity of ammonium and nitrate compound to pacific tree frog and African clawed frog tadpoles [J]. Environ Toxicol Chem, 18(10): 2251~2256.