科学通报 2010 年 第 55 卷 第 29 期：2823 ~ 2827
论 文 www.scichina.com csb.scichina.com
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS

非离子态氨对转“全鱼”生长激素基因鲤鱼的急性毒性和慢性毒性

管波[①②], 胡炜[①*], 张堂林[①], 段明[①②], 李德亮[①②], 汪亚平[①], 朱作言[①]

① 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072;
② 中国科学院研究生院, 北京 100049
* 联系人, E-mail: huwei@ihb.ac.cn

2010-02-27 收稿, 2010-04-27 接受
国家重点基础研究发展计划(2007CB109205, 2009CB118804)和国家自然科学基金(30623001)资助项目

摘要 在自然水体和人工水体中氨氮对鱼类是有毒的. 利用静水更新式生物测试研究了非离子态氨对转基因鲤鱼和对照鱼的 96 h 急性毒性实验和 21 d 慢性毒性实验. 通过 96 h 非离子态氨急性毒性实验发现, 转基因鲤鱼的非离子态氨氮 24, 48, 72 和 96 h 半数致死浓度(LC_{50}) (2.64, 2.44, 2.28 和 2.16 mg/L)分别比对照鲤鱼相应的 24, 48, 72 和 96 h 半数致死浓度(LC_{50}) (2.70, 2.64, 2.52 和 2.33 mg/L)略低, 没有显著性差异; 但在不同非离子态氨氮(3.86, 3.29 和 2.09 mg/L)胁迫下, 转基因鲤鱼的半数致死时间(LT_{50}) (1.41, 7.91 和 117.42 h)分别显著性短于对照鱼的半数致死时间(2.53, 14.06 和 150.44 h). 21 d 非离子态氨慢性毒性实验发现, 在不同非离子态氨氮浓度(0.91 ± 0.12, 0.48 ± 0.06 和 0.12 ± 0.01 mg/L)胁迫下, 转基因鲤鱼的死亡率均显著性高于对照鲤鱼. 上述研究表明, 转基因鲤鱼对氨氮胁迫的耐受能力比对照鲤鱼差, 为客观评价转生长激素基因鲤鱼潜在生态风险, 并为今后确定转 GH 基因鱼集约化养殖的密度和制定养殖水体氨氮安全指标提供了重要的科学参数.

关键词
转基因鲤鱼
生长激素
非离子态氨
毒性
死亡率

由于工农业污水的大量排放和有机废物的降解等, 氨氮广泛分布于各种自然水体中. 水产集约化养殖中, 含氮代谢产物排放及残饵和粪便降解等因素容易引起氨氮在养殖水体中高水平积累. 非离子态氨和离子铵是氨氮在水体中的两种存在形式, 其中, 非离子态的氨(NH_3)作为一种中性分子相对于带电荷的离子铵(NH_4^+)而言, 较容易通过鱼类等水生生物的上皮细胞膜, 对鱼类等水生生物有较强的毒性[1]. 目前人们通过大量的实验研究了非离子态氨对鱼类的急性毒性和慢性毒性. 其中, 高水平的非离子态氨急性毒性能引起鱼类抽搐、昏迷甚至死亡等[2]. 低剂量的非离子氨慢性毒性的主要效应为亚致死影响, 如削弱鱼类游泳活动能力[3], 损伤鱼类的鳃、肝脏以及肾脏造成组织[4], 降低鱼体的免疫力, 增加细菌的易感性[5,6], 抑制鱼类生长[7]. 此外, 在集约化养殖中氨氮浓度与循环水养殖或池塘养殖密度有紧密的关系[8,9]. 因此, 无论是自然水体还是水产养殖水体中, 氨氮是对鱼类的主要环境胁迫因子之一.

从转基因鱼诞生至今已培育出 30 多种转基因鱼, 但迄今尚无一例转基因鱼产业化[10,11]. 制约其产业化的瓶颈因素在于对其潜在生态风险的担忧[12,13]. 转生长激素基因鱼生长速度快, 饵料转化效率高, 但是, 生长激素基因的转植, 除改变转基因鱼的生长特性外, 还改变了转基因鱼的许多生物学特性, 如非特异免疫特征[14]、游泳能力[15]、骨骼结构[16]、海水适应能力[17]等. 这些生物学特征的改变是否改变转基因鱼在自然水体中的生存力尚不知晓. 研究转基因鱼的生存力是客观评价转基因鱼是否具有潜在生态

英文版见: Guan B, Hu W, Zhang T L, et al. Acute and chronic un-ionized ammonia toxicity to “all-fish” growth hormone transgenic common carp (*Cyprinus carpio* L.). Chinese Sci Bull, 2010, 55, doi: 10.1007/s11434-010-4165-5

风险的重要研究内容[12,13]. 此外, 建立与快速生长转基因鱼优良品质性状相适应的养殖模式与技术标准, 是今后转基因鱼产业化健康发展的重要保证. 氨氮对鱼类是一种重要环境胁迫因子, 但迄今尚未见转生长激素鱼对氨氮毒性的耐受特性研究报道. 因此, 本研究以转全鱼 GH 基因鲤鱼为材料, 旨在初步探讨非离子态氨对转全鱼 GH 基因鲤鱼的急性毒性和慢性毒性, 为研究转 GH 基因鱼的种群适合度以客观评价其潜在生态风险, 并为今后确定转 GH 基因鱼集约化养殖的合理密度和制定养殖水体氨氮安全指标提供重要的科学参数.

1 材料与方法

(ⅰ) 材料鱼. "全鱼"转植基因 *pCAgcGH* 由鲤鱼基因 *β-actin* 启动子驱动草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)生长激素基因构成. P_0, F_1, F_2, F_3, F_4 和 F_5 代转基因鱼繁育方法见 Guan 等人[18]的报道. 2006 年 4 月 14 日用 F_3 代转基因雄鱼和对照雌鱼交配获得 F_4 代转基因鱼及其同胞对照鱼, 开口摄食后 F_4 代转基因鱼及其同胞对照鱼养殖在野外池塘中. 大约 2000 尾 60 日龄的 F_4 代转基因鱼及其同胞对照鱼于 2006 年 6 月 15 日从野外转入到室内循环水养殖系统中, 实验前驯化时间至少持续 1 月以上. 驯养期间, 每天按基本相同的投喂率投喂 2 次, 水中溶氧高于 7.00 mg O_2/L, 氨氮浓度低于 0.40 mg/L, pH 在 7.00~7.60 之间, 水温在 26 和 29.5℃之间, 人工照明控制光照周期为 12L:12D.

剪取实验鱼适量的尾鳍组织, 通过 chelex 100 方法提取总 DNA[19]用于 PCR 检测, 将转基因鱼和其同胞对照鱼(阴性鱼)区分开, 其中同胞对照鱼用作实验对照鱼. PCR 检测用的上游引物 GHF1 (5′-CGGTTTTCTCATTCATTTACAGT-3′)和下游引物 GHR1 (5′-TACCATCTACAACATCGTTCCTA-3′), 目的片段为 283 bp. PCR 反应程序: 94℃预变性 5 min, 扩增 35 个循环(94℃, 30 s; 56℃, 30 s; 72℃, 30 s), 最后 72℃延伸 5 min.

氨氮急性毒性实验材料鱼为 2006 年繁殖的 F_4 代转基因鱼. 氨氮慢性毒性实验材料鱼为 2007 年繁殖的 F_5 代转基因鱼及其同胞对照鱼, 生产方法和驯化方法及 PCR 检测均与 2006 年所用 F_4 代转基因鱼及其同胞对照鱼处理方法相同.

(ⅱ) 实验用水和水质分析. 用美国 YSI 金泉 550A 溶氧仪测定溶氧和温度, 用 Delta 320 型 pH 计(Mettler-Toledo, 上海)测定 pH. 氨氮浓度用纳氏比色法测定[20]. 非离子氨和总氨氮的浓度用 mg N/L 表示[1].

非离子态氨计算方法基于如下公式[21]:

$$[NH_3]=\frac{[NH_3+NH_4^+]}{1+10^{(pKa-pH)}},$$

p*K*a 为 $NH_3 + H_2O \leftrightarrow NH_4^+ + OH^-$ 的平衡常数, 计算方法为: p*K*a = 0.09018 + 2729.92/*T* (*T* 为开尔文温度).

(ⅲ) 氨氮毒性急性毒性实验. 利用静水更新式生物测试(static-renewal bioassays)进行急性氨氮毒性实验, 用于计算转基因鲤鱼和对照鱼的半数致死浓度(LC_{50})和半数致死时间(LT_{50}). 氨氮储存液用分析纯 NH_4Cl 在 1500 L 的塑料缸中配制, 实验用水为脱氯自来水, 同时用 0.47 mol/L 的 Na_2CO_3 和 1 mol/L HCl 调 pH 到 8.0 左右, 作为储存液, 其体积大约为 879.2 L. 实验时设置对数浓度梯度为 9.69, 13.67, 19.21, 27.48, 41.43, 54.16 mg/L 总氨氮, 对照组不加氯化铵(总氨氮 0.21 mg/L) (经预备实验确定正式实验液浓度范围), 实验过程中的实际氨氮浓度用纳氏比色法测定, 非离子氨浓度依赖于总氨氮浓度、pH 和温度等参数. 实验前第 7 天, 剪鳍条标记转基因鱼和其同胞对照鱼. 实验前 1 天停止投喂, 转基因鱼均重为(1.68±0.05) g, 对照鱼均重为(1.57±0.05) g, 体重无显著性差异(ANOVA, P>0.05). 实验前将配制好的储存液转移到 120 L 的塑料桶中, 共 6 个浓度梯度及 1 个对照组, 每个梯度 3 个重复, 实验液体积为 80 L. 2006 年 7 月 14 日, 按每个塑料桶放置转基因鱼和同胞对照鱼各 20 尾, 将实验鱼随机放到同一塑料容器中, 转移过程中注意尽可能减少对实验鱼的刺激. 实验期间对实验溶液进行轻微充气, 溶氧浓度为高于 7.00 mg/L. 每隔 4 h 记录各个实验溶液的参数(温度、pH 和溶氧浓度), 并用 0.47 mol/L Na_2CO_3 或 1 mol/L HCl 调 pH, 使其保持稳定. 每隔 1 h 记录实验鱼死亡数目和死亡时间, 其中鱼苗死亡判断方法为, 停止游泳且用玻璃棒刺激鱼苗无反应即为死亡. 实验液每隔 24 h 更换 1 次.

(ⅳ) 氨氮慢性毒性实验. 氨氮慢性毒性实验前 2 周, 大约 140 尾 F_5 代转基因鱼用金属标记(Northwest Marine Technology, Inc., 美国), 大约 140 尾同

胞对照鱼不标记，饲养在循环水养鱼系统中. 2008 年 8 月 18 日，氨氮慢性毒性实验容器为 4 个塑料桶 (直径 150 cm，体积 1500 L). 设置 4 个浓度梯度，实验液体积约为 927 L，实验用水为脱氯自来水，分别加入氯化铵(0, 7.06, 35.28 和 70.57 g). 实验过程中实际的氨氮浓度用纳氏比色法测定，非离子氨浓度由总氨氮浓度、pH 和温度共同决定. 4 组实验液用 0.47 mol/L Na_2CO_3 和 1 mol/L HCl 调节 pH 到 8.0 左右. 将 32 尾转基因鱼和 32 尾同胞对照鱼随机分配到同一塑料桶中，对照鱼均重为(5.36 ± 1.00) g，转基因鱼均重为(5.53 ± 1.13) g，转基因鱼和对照鱼之间体重没有显著性差异(P>0.05). 实验期间对实验溶液进行轻微充气，溶氧浓度为高于 7.00 mg/L. 每隔 24 h 记录各个实验溶液的参数(温度、pH 和溶氧浓度)，实验液每隔 24 h 更换 1 次. 实验周期为 21 d，每天 8:30 和 14:30 饱食投喂 2 次，饵料为商用冷冻红虫.

(V) 统计和数据分析. 非离子态氨对实验鱼的 LC_{50} 和 LT_{50} 及其 95%置信区间通过 STATISTICA 6.0 统计软件 Probit 过程来估算，依据 95%置信区间没有重叠来判定两组之间的 LC_{50} 和 LT_{50} 存在显著性差异[22]. 结果均用平均值±标准误表示. 慢性毒性对转基因鱼和对照鱼的死亡率影响比较采用卡方检验(chi square test). P<0.05 表示差异显著. 统计软件为 STATISTICA 6.0，科学绘图工具为 SigmaPlot 8.0.

2 结果

2.1 急性毒性实验

96 h 氨氮急性毒性实验期间，pH 维持在 7.95~8.06 之间，水温维持在 28.5~29.5℃. 溶氧浓度变化较小，接近饱和(大于 7.00 mg/L). 实际测定的各实验组总氨氮浓度分别是 0.21 (对照组)，9.69，13.67，19.21，27.48，41.43 和 54.17 mg N/L；非离子氨浓度分别为 0.015(对照组)，0.75，0.10，1.46，2.09，3.29 和 3.86 mg N/L. 实验过程中，3 个低浓度组(≤1.46 mg NH_3-N/L) 和对照组没有实验鱼死亡. 通过 96 h 急性毒性实验，发现非离子态氨对转基因鲤鱼的 24，48，72 和 96 h LC_{50} (2.64, 2.44, 2.28 和 2.16 mg/L)分别比同胞对照鱼的 24, 48, 72 和 96 h LC_{50} (2.70, 2.64, 2.52 和 2.33 mg/L)略低，但没有显著性差异(表 1). 同时也发现，转基因鲤鱼和同胞对照鱼的 LT_{50} 随着非离子态氨浓度增加而下降. 在不同非离子态氨氮(3.86, 3.29 和 2.09 mg/L)胁迫下转基因鲤鱼的 LT_{50} (1.41, 7.91 和 117.42 h)分别显著性短于同胞对照鱼的 LT_{50} (2.53, 14.06 和 150.44 h)(表 2).

2.2 氨氮慢性毒性实验

在 21 d 实验期间，溶氧浓度大于 7.00 mg/L，pH 维持在 7.9~8.1 之间，水温维持在 24~25℃之间. 经过 21 d 氨氮慢性胁迫实验，发现在不同非离子态氨氮浓度(实验组，0.91 ± 0.12, 0.48 ± 0.06 和 0.12 ± 0.01 mg/L；对照组，0.010 ± 0.002 mg/L) 胁迫下，在相同浓度非离子态氨胁迫条件下，转基因鲤鱼的死亡率显著性高于对照鲤鱼(图 1).

表 1 非离子态氨对转基因鲤鱼和对照鱼的 LC_{50} 值

	24 h LC_{50} (95% CI)[a]	48 h LC_{50} (95% CI)[a]	72 h LC_{50} (95% CI)[a]	96 h LC_{50} (95% CI)[a]
转基因鱼	2.64 (2.40~2.89)	2.44 (2.20~2.70)	2.28 (2.10~2.47)	2.16 (2.02~2.32)
对照鱼	2.70 (2.48~2.93)	2.64 (2.39~2.94)	2.52 (2.33~2.75)	2.33 (2.20~2.47)

a) 非离子态氨氮浓度为 mg N/L; CI，置信区间

表 2 在不同氨氮浓度下转基因鲤鱼和对照鱼的 LT_{50} 值

非离子氨氮 (mg N/L)	转基因鱼 LT_{50} (h)[a] (95% CI)	对照鱼 LT_{50} (h) (95% CI)
2.09	117.42(110.58~126.16)*	150.44(136.80~169.77)
3.29	7.91(6.85~8.94)*	14.06(12.51~15.74)
3.86	1.41(1.09~1.72)*	2.53(2.00~3.03)

a) *表示在相同氨氮浓度下，95%置信区间没有重叠，两组之间 LT_{50} 存在显著性差异

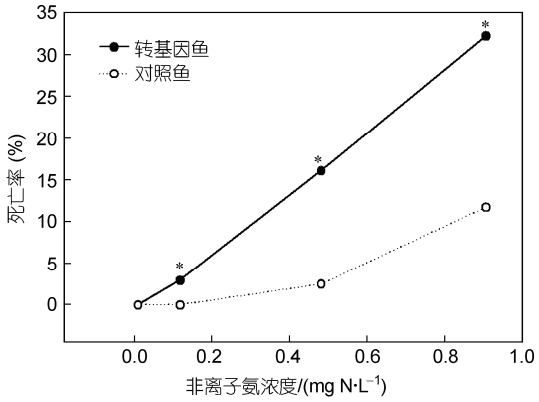

图 1 慢性氨氮毒性对转基因鲤鱼和对照鱼死亡率的影响

* 表示卡方检验后具有显著性差异(P < 0.05)

3 讨论

本研究通过 96 h 急性毒性实验, 发现转全鱼 GH 基因鲤鱼在不同浓度非离子态氨氮胁迫下, 转基因鲤鱼的 LT_{50} 显著性短于对照鲤鱼的 LT_{50}. 通过 21 d 的慢性毒性实验发现与同胞对照鱼比较转基因鲤鱼具有较高的死亡率. 而且, 研究不同非离子态氨氮浓度对转基因鱼生长的影响, 发现转基因鲤鱼的平均体重均没有显著性增加, 而对照鲤鱼平均体重均显著性增加(未发表资料). 因此, 转基因鲤鱼对非离子态氨毒性比对照鲤鱼更敏感, 转基因鲤鱼对氨氮胁迫的耐受能力比对照鲤鱼差.

转基因鱼的生存力是客观评价其潜在生态风险的重要参数[12,13]. 氨氮广泛分布于各种自然水体中, 氨氮已成为胁迫鱼类生存的重要环境因子之一[2]. 有研究发现氨氮能够削弱褐鳟(*Salmo trutta* L.)避险能力, 社会相互作用和捕食行为因此被扰乱, 同时捕食者-猎物的关系发生改变[23]. 转 GH 基因鱼对氨氮胁迫的耐受能力尚未见任何报道, 本研究发现转生长激素基因鲤鱼对氨氮胁迫耐受能力下降. 因此, 在自然水体中, 氨氮浓度增加可能会对转 GH 基因鲤鱼的生存适合度产生负面影响.

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[24]. 研究在池塘养殖和循环水养殖系统中养殖密度对鱼类生长的影响, 以及鱼类养殖密度与水质(包括氨氮) 之间的关系非常重要[8,9]. Biswas 等人[9]研究发现在小养殖系统中养殖鲤鱼氨氮是影响合适养殖密度的主要因子. 本研究发现转 GH 基因鲤鱼对氨氮毒性具有较低的耐受能力. 此外, 我们也发现转 GH 基因鲤鱼具有较高的日常摄食率, 而且摄食后的耗氧率显著高于对照鲤鱼[18], 因此, 在转 GH 基因鲤鱼集约化养殖过程中可能需要降低养殖密度. 当然, 转 GH 基因鱼集约化养殖模式中合理的养殖密度及其对转 GH 基因鱼生长和生存力的影响, 还有待深入研究.

转 GH 基因鲤鱼对氨氮毒性比对照鱼更敏感是一个有趣的发现. 氨对所有的脊椎动物是有毒的, 可能的机制是: NH_4^+置换 K^+, 使神经元去激化, 激活谷氨酸受体 N-甲基-D-天门冬氨酸受体(NMDA-R), 引起过多的 Ca^{2+}进入神经元, 导致中枢神经系统细胞死亡[2,25]. 那么, 在转 GH 基因鲤鱼脑组织中过表达的 GH 和 NMDA-R 之间是否存在某种内在联系呢? Bhat 等人[26]通过免疫组织化学技术研究 GH 和 NMDA-R 之间的关系, 发现在大鼠垂体前叶的一些分泌促黄体激素、促卵泡成熟激素、生长激素、促甲状腺激素刺激激素和催乳素的细胞中广泛分布着 NMDA-R1. Le Grevès 等人[27,28]发现, 将重组人生长激素注射到体内能诱导大鼠大脑海马中的 NMDA-R (NR2A 和 NR2B)表达, 且 GH 受体(GHR)表达与 NR2A 和 NR2B 表达呈现正相关性. 这些研究说明大鼠海马细胞表面有丰富的 GH 受体, GH 能通过这些 GH 受体进一步诱导 NMDA-R(NR2A 和 NR2B)表达[27]. 而且, 有大量的研究表明垂体中分布的 NMDA-R 能够调节 GH 的分泌, 如猕猴(*Macaca mulatta*)[29], 大鼠[30]和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)[31]. 因此, 我们推测, 转 GH 基因鲤鱼过表达的 GH 信号能够通过 GH 受体或 IGF-1 受体诱导转大脑组织细胞中 NMDA-R 表达增加, 从而在高浓度氨氮胁迫下, 氨氮能更加过度激活 NMDA-R, 加重氨的神经毒性, 引起转基因鱼死亡.

总之, 本研究初步揭示转 GH 基因鲤鱼对非离子氨氮毒性耐受能力比对照鱼差. 转 GH 基因鲤鱼对非离子氨氮毒性耐受能力减弱的分子机制及其合适的养殖密度需要仍有待进一步研究.

参考文献

1 USEPA. Update of ambient water quality criteria for ammonia—Technical version-1999. EPA-823-F-99-024. USEPA, Washington DC, USA, 1999

2 Randall D J, Tsui T K N. Ammonia toxicity in fish. Mar Pollut Bull, 2002, 45: 17—23

3 Shingles A, McKenzie D J, Taylor E W, et al. Effects of sublethal ammonia exposure on swimming performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J Exp Biol, 2001, 204: 2691—2698

4 Benli A K, Köksal G, Özkul A. Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): Effects on gill, liver and kidney histology. Chemosphere, 2008, 72: 1355—1358

5 Das P C, Ayyappan S, Jena J K, et al. Acute toxicity of ammonia and its sub-lethal effects on selected haematological and enzymatic parameters of mrigal, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). Aquac Res, 2004, 35: 134—143

6 Liu C H, Chen J C. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. Fish Shellfish Immunol, 2004, 16: 321—334

7 El-Shafai S A, El-Gohary F A, Nasr F A, et al. Chronic ammonia toxicity to duckweed-fed tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture, 2004, 232: 117—127

8 Sumagaysay-Chavoso N S, San Diego-McGlone M L. Water quality and holding capacity of intensive and semi-intensive milkfish (*Chanos chanos*) ponds. Aquaculture, 2003, 219: 413—429

9 Biswas J K, Sarkar D, Chakraborty P, et al. Density dependent ambient ammonium as the key factor for optimization of stocking density of common carp in small holding tanks. Aquaculture, 2006, 261: 952—959

10 Zhu Z, Li G, He L, et al. Novel gene transfer into the fertilized eggs of goldfish (*Carassius auratus* L. 1758). Z Angew Ichthyol, 1985, 1: 31—34

11 Hallerman E M, McLean E, Fleming I A. Effects of growth hormone transgenes on the behavior and welfare of aquacultured fishes: A review identifying research needs. Appl Anim Behav Sci, 2007, 104: 265—294

12 Devlin R H, Sundstrom L F, Muir W M. Interface of biotechnology and ecology for environmental risk assessments of transgenic fish. Trends Biotechnol, 2006, 24: 89—97

13 Hu W, Wang Y P, Zhu Z Y. Progress in the evaluation of transgenic fish for possible ecological risk and its containment strategies. Sci China Ser C-Life Sci, 2007, 50: 1—7

14 Wang W, Wang Y, Hu W, et al. Effects of the “all-fish” growth hormone transgene expression on non-specific immune functions of common carp, *Cyprinus carpio* L. Aquaculture, 2006, 259: 81—87

15 Li D L, Fu C Z, Hu We, et al. Rapid growth cost in “all-fish” growth hormone gene transgenic carp, reduced critical swimming speed. Chinese Sci Bull, 2007, 52: 1501—1506

16 Ostenfeld T, Mclean H E, Devlin R H. Transgenesis changes body and head shape in Pacific salmon. J Fish Biol, 1998, 52: 850—854

17 Seddiki H, Boeuf G, Maxime V, et al. Effects of growth hormone treatment on oxygen consumption and seawater adaptability in Atlantic salmon parr and pre-smolts. Aquaculture, 1996, 148: 49—62

18 Guan B, Hu W, Zhang T L, et al. Metabolism traits of “all-fish” growth hormone transgenic common carp (*Cyprinus carpio* L.). Aquaculture, 2008, 284: 217—223

19 Walsh P S, Metzger D A, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques, 1991, 10: 506—513

20 APHA (American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th ed. New York: American Public Health Association, 1998. 1038

21 Emerson K, Russo R C, Lund R E, et al. Aqueous ammonia equilibrium calculations: Effect of pH and temperature. J Fish Res Board Can, 1975, 32: 2379—2383

22 Mason G A, Johnson M W, Tabashnik B E. Susceptibility of *Liriomyza sativae* and *L. trifolii* (Diptera: Agromyzidae) to permethrin and fenvalerate. J Econ Entomol, 1987, 80: 1262—1266

23 Tudorache C, Blust R, De Boeck G. Social interactions, predation behaviour and fast start performance are affected by ammonia exposure in brown trout (*Salmo trutta* L.). Aquat Toxicol, 2008, 90: 145—153

24 Colt J. Water quality requirements for reuse systems. Aquac Eng, 2006, 34: 143—156

25 Monfort P, Kosenko E, Erceg S, et al. Molecular mechanism of acute ammonia toxicity: Role of NMDA receptors. Neurochem Int, 2002, 41: 95—102

26 Bhat G K, Mahesh V B, Chu Z W, et al. Localization of the *N*-methyl-*D*-aspartate R sub(1) receptor subunit in specific anterior pituitary hormone cell types of the female rat. Neuroendocrinology, 1995, 62: 178—186

27 Le Grevès M, Steensland P, Le Grevès P, et al. Growth hormone induces age-dependent alteration in the expression of hippocampal growth hormone receptor and *N*-methyl-*D*-aspartate receptor subunits gene transcripts in male rats. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 7119—7123

28 Le Grevès M, Le Grevès P, Nyberg F. Age-related effects of IGF-1 on the NMDA-, GH- and IGF-1-receptor mRNA transcripts in the rat hippocampus. Brain Res Bull, 2005, 65: 369—374

29 Rizvi S S R, Altaf S. Differential effects of *N*-methyl-*D*-aspartate receptor stimulation on growth hormone secretion at specific stages of postnatal development of the male rhesus monkey. Life Sci, 2000, 67: 783—797

30 Tena-Sempere M, Pinilla L, Gonzalez L C, et al. Regulation of Growth Hormone (GH) secretion by different glutamate receptor subtypes in the rat. Amino Acids, 2000, 18: 1—16

31 Holloway A C, Leatherland J F. The effects of *N*-methyl-*D*, *L*-aspartate and gonadotropin-releasing hormone on *in vitro* growth hormone release in steroid-primed immature rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Gen Comp Endocrinol, 1997, 107: 32—43