

侯文杰,臧维玲,刘永士,等. 盐度及钙镁离子含量对对虾消化酶及免疫酶的影响[J]. 江苏农业科学,2013,41(7):222-225.

盐度及钙镁离子含量对对虾消化酶及免疫酶的影响

侯文杰^{1,2}, 臧维玲², 刘永士^{1,2}, 戴习林², 丁福江³, 杨明³

(1. 上海市水产研究所, 上海 200433; 2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 200090;

3. 上海市申漕特种水产开发公司, 上海 201516)

摘要:以海水(第1组)、河口水(第3组)、淡水(第5组)及以淡水为基础添加与海水、河口水相应的钙镁离子含量的调配水(第2组与第4组)进行对虾养殖试验,探讨了盐度及钙镁离子含量对凡纳滨对虾消化酶及免疫酶活性的影响。经60d养殖后试验结果表明:试验虾肝胰脏中胰蛋白酶、胃蛋白酶、淀粉酶等消化酶的活性随盐度升高呈先升后降的变化特点,但脂肪酶的活性则随盐度升高逐渐降低;盐度过高或过低都会对 AKP、ACP 活性产生不良影响,淡水组 SOD 活性最高,溶菌酶活性随盐度的升高而升高。说明河口水更适合凡纳滨对虾生长。

关键词:盐度;钙镁离子;凡纳滨对虾;消化酶;免疫酶

中图分类号: S917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)07-0222-04

凡纳滨对虾是世界重要的对虾养殖品种,由于其具有较强的盐度适应能力,目前在许多地区得到了推广养殖^[1]。盐度及钙镁离子含量是对虾养殖中重要的环境因子,它直接影响着对虾的生长、存活和代谢、免疫等生理活动。目前,关于盐度对于对虾生理影响的研究多集中于盐度突变^[2-4]和盐度的长期效应^[5-8],且研究结果有很大差异性^[9]。关于凡纳滨对虾免疫功能的研究虽有不少报道^[10-13],但有关盐度及钙镁离子含量对凡纳滨对虾消化酶及免疫酶影响的研究报道甚少。本试验拟通过探讨环境盐度及钙镁离子含量对凡纳滨对虾肝胰脏消化酶及免疫酶的影响,为对虾生物学研究与养殖生产提供科学依据。

1 材料与与方法

1.1 试验设计

表1为各试验组盐度、钙镁离子含量及比值。试验设5个梯度,分别以第1、2、3、4、5组表示。据海水、河口水的盐度与相应 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 含量及比值的变化范围^[14-16],以浓缩海水、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 将第1、3组调至表1所示盐度与 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 含量及比值;仅以 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 将第2、4组调至表1所示 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 含量及比值;第5组为当地河水。如此获得5种类型水进行对虾养殖试验,各设3个平行。

1.2 试验用虾与养殖设施

养殖试验池为上海申漕特种水产开发公司卤虫孵化池,池上部为长方体(1.64 m × 1.62 m × 0.73 m),下部为圆锥体($h=0.4$ m),中心设排污管,养殖水体 2 m³。河水经暗沉淀、消毒、充分曝气后注入试验池作养殖基础用水,试验虾为海南

表1 试验盐度与 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 浓度和比值

组别	盐度 (%)	Ca^{2+} 浓度 (mg/L)	Mg^{2+} 浓度 (mg/L)	Mg^{2+} 浓度/ Ca^{2+} 浓度
1	3.20	390	1 200	3.10
2	0.62	390	1 200	3.10
3	1.30	180	360	2.00
4	0.22	180	360	2.00
5	0.04	44	12	0.27

淡化苗,经15d升盐与降盐驯化后布入试验池,池水连续充气,并悬挂预先培养生物膜的人工净水网(简称净水网),网具良好水质净化作用^[17]。布苗简况见表2。

表2 试验池布苗简况

组别	布苗密度 (ind/m ³)	平均体长 (cm)	平均体重 (g)
1	300	2.67 ± 0.54	0.22 ± 0.10
2	300	2.96 ± 0.56	0.32 ± 0.18
3	300	2.99 ± 0.36	0.30 ± 0.08
4	300	2.98 ± 0.62	0.31 ± 0.17
5	300	2.78 ± 0.42	0.25 ± 0.11

1.3 试验日常管理

60d养殖期间,每天定时定量投喂商业饲料,适时排污与补充蒸发、渗漏、排污损失水量,视水质状况适当换水,保证各水质指标均在対虾的安全生长范围内,有利于对虾的生长。

1.4 样品制备

试验结束时,随机取规格相近的各试验组虾,冰浴解剖出肝胰脏,电子分析天平称取一定量肝胰脏(50~150 mg),置于玻璃匀浆器,准确加入5倍体积4℃去离子水,冰浴匀浆。匀浆液冷冻离心30 min(0~2℃,12 000 r/min),取上清液测定酶活性。

1.5 消化酶及免疫酶测定

蛋白质含量用 Bradford 法^[18]测定。

蛋白酶活性采用福林-酚法^[19]测定:在 pH 值 9.8 的条件下,37℃水浴反应 15 min,以酶液 1 min 水解干酪素产生 1 μg 酪氨酸作为 1 个酶活性单位(U)。

收稿日期:2013-02-26

作者简介:侯文杰(1985—),男,山东海阳人,硕士研究生,工程师,主要从事水产养殖、渔业水环境及其调控研究。E-mail: wjhou01@163.com。

通信作者:戴习林,副教授,主要从事水产养殖与渔业水环境调控研究。E-mail: xldai@shou.edu.cn。

淀粉酶活性采用 3,5-二硝基水杨酸显色法(DNS法)^[20-21]测定:在 pH 值为 6.9 的条件下,1 min 催化淀粉生成 1.0 μg 麦芽糖作为 1 个酶活性单位(U)。

脂肪酶活性采用以聚乙烯醇橄榄油为底物的标准氢氧化钠溶液滴定法^[20-21]测定:在 pH 值为 7.5 的条件下,40 ℃ 水浴反应 15min,以脂肪酶水解脂肪 1 min 产生 1 μg 分子脂肪酸所需的酶量定为 1 个活性单位(U)。

酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、超氧化物歧化酶(SOD)均以检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)测定。

1.6 数据处理

试验数据采用最小显著差数法多重比较(LSD)。

2 结果与分析

2.1 盐度及钙镁离子含量对凡纳滨对虾消化酶的影响

2.1.1 盐度及钙镁离子含量对凡纳滨对虾胰蛋白酶的活性影响

由图 1 可知,第 4 组试验虾肝胰脏中胰蛋白酶活性最高(0.51 U/mg),第 5 组最低(0.32 U/mg),第 2、3、4 组酶活性相近。第 4 组与第 1、5 组间均差异极显著($P < 0.01$);第 1、5 组间差异显著($P < 0.05$),与其他 3 组间均存在极显著差异($P < 0.01$);第 2、3、4 组间差异不显著。

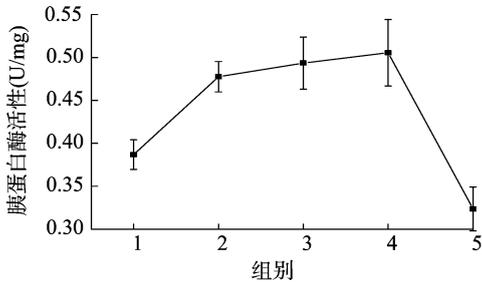


图1 不同试验组凡纳滨对虾肝胰脏胰蛋白酶活性比较

2.1.2 盐度及钙镁离子含量对凡纳滨对虾胃蛋白酶的活性影响

图 2 表明,第 2 组胃蛋白酶活性最高组,为 0.218 U/mg;第 1、5 组胃蛋白酶活性最低且相近,分别为 0.148、0.145 U/mg。第 2 组与第 3 组差异显著($P < 0.05$),与第 4 组差异不显著($P > 0.05$),第 1 组与第 2、3、4 组均存在极显著性差异($P < 0.01$),第 5 组与第 2、3、4 组也均差异极显著($P < 0.01$),而第 1 组与第 5 组差异不显著($P > 0.05$),第 2 组与第 3 组差异显著($P < 0.05$),与第 4 组间无显著差异($P > 0.05$)。

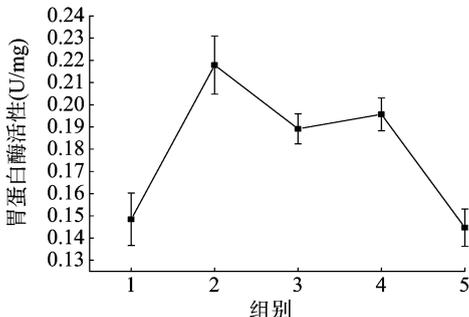


图2 不同试验组凡纳滨对虾肝胰脏胃蛋白酶活性比较

2.1.3 盐度及钙镁离子含量对凡纳滨对虾淀粉酶的影响

由图 3 可见,第 3 组淀粉酶活性最高,达 1 048.9 U/mg,第 1

组淀粉酶活性最低,与其余各组均差异显著($P < 0.05$),其余 4 组两两间均无显著性差异($P > 0.05$)。

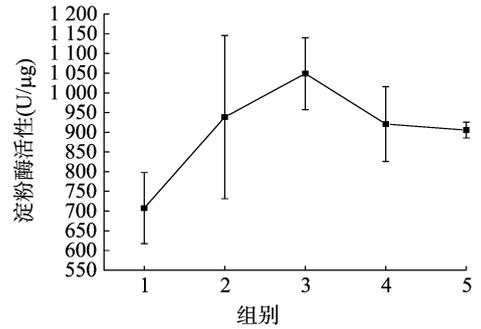


图3 不同试验组凡纳滨对虾肝胰脏淀粉酶活性比较

2.1.4 盐度及钙镁离子含量对凡纳滨对虾脂肪酶的活性影响

由图 4 可以看出,第 5 组脂肪酶活性最高,达 0.46 U/mg,第 1 组脂肪酶活性最低,为 0.23 U/mg,与第 4、5 组差异显著($P < 0.05$),第 2 组与第 4、5 组差异极显著($P < 0.01$),其余组两两间无显著性差异($P > 0.05$)。

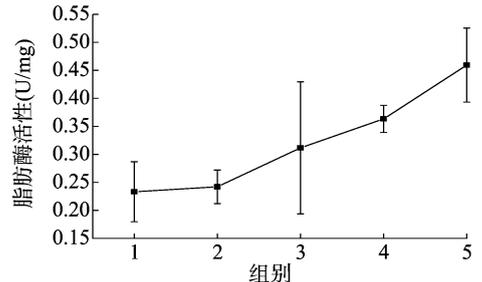


图4 不同试验组凡纳滨对虾肝胰脏脂肪酶活性比较

2.2 盐度及钙镁离子含量对免疫酶的影响

2.2.1 盐度及钙镁离子含量对酸性磷酸酶(ACP)的活性影响

从各试验组凡纳滨对虾肝胰脏酸性磷酸酶(ACP)活性测定结果(图 5)可以看出,第 2 组 ACP 活性最低,第 4 组 ACP 活性最高(3.58 U/mg),两组间有显著性差异($P < 0.05$),其余组间无显著性差异($P > 0.05$)。

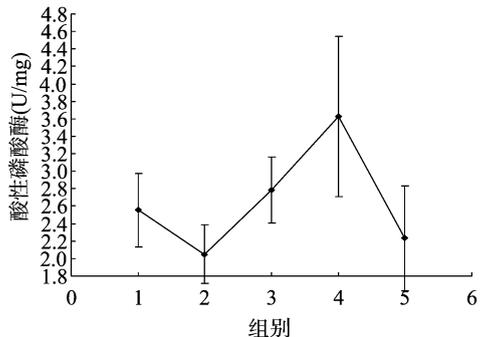


图5 不同试验组凡纳滨对虾肝胰脏酸性磷酸酶活性比较

2.2.2 盐度及钙镁离子含量对碱性磷酸酶(AKP)活性的影响

由图 6 可见,第 1 组 AKP 活性最低(1.52 U/mg),近于第 5 组。第 4 组 AKP 活性最高,为 2.41 U/mg,与第 2、3 组相近,其虽高于第 1、5 组,但各试验组间均无显著性差异($P > 0.05$)。

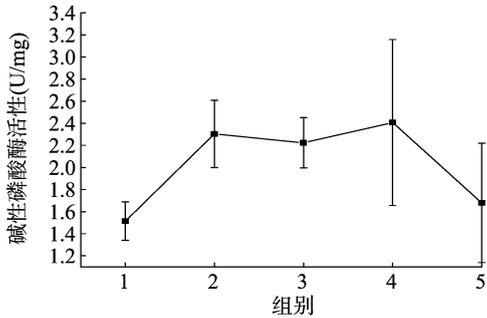


图6 不同试验组凡纳滨对虾肝胰脏碱性磷酸酶活性比较

2.2.3 盐度及钙镁离子含量对超氧化物歧化酶(SOD)的影响 图7显示,第5组SOD活性最强,为13.29 U/mg,第3组次之,第1、2、4组相近,第2组最低为2.61 U/mg,第3、5组分别与第1、2、4组存在极显著性差异($P < 0.01$),第3、5组间无显著性差异($P > 0.05$)。

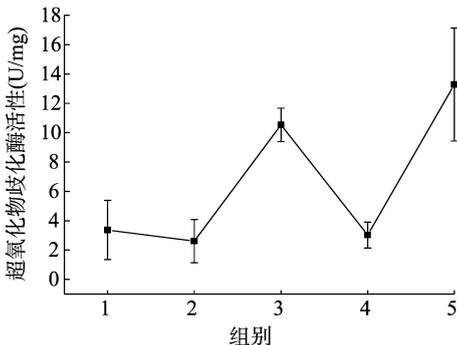


图7 不同试验组凡纳滨对虾肝胰脏超氧化物歧化酶活性比较

2.2.4 盐度及钙镁离子含量对溶菌酶的影响 图8显示,第1组对虾溶菌酶活性最高(7.59 U/mg),第5组活性最低,仅2.74 U/mg。经显著性检验,第5组分别与第1、3组间有极显著性差异($P < 0.01$),第2、5组间有显著性差异($P < 0.05$);第4组与第1、3组间有极显著性差异($P < 0.01$),第2、4组间有显著性差异($P < 0.05$);第1、2组间也有显著性差异($P < 0.05$)。

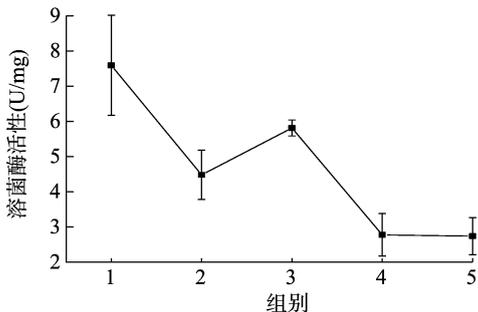


图8 盐度及钙镁离子含量对凡纳滨对虾溶菌酶活性的影响

3 讨论

3.1 盐度及钙镁离子含量对凡纳滨对虾消化酶的影响

试验虾肝胰脏中胰蛋白酶、胃蛋白酶、淀粉酶等消化酶的活性随盐度增加呈先升后降的变化特点,但脂肪酶的活性则随盐度升高逐渐降低。第2组胃蛋白酶活性最高,胰蛋白酶

与淀粉酶活性也较高,在5个试验组中分别处于第3、2位,该组仅将钙镁含量与比值调整至海水范围,其盐度、离子成分及其比值与自然海水相比严重失调。黄凯等发现,低盐度($S = 1$)组养殖的凡纳滨对虾蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶活性均高于高盐度组,认为可能是虾体内存在较大的渗透压梯度差,为维持自身渗透压平衡需消耗更多的能量,因此在非等渗环境下需要较高的消化酶活性用于消化食物^[22]。试验发现,第1、3组养殖试验用水盐度、离子成分近于自然海水与河口水,试验虾摄食旺盛,特别是第3组,对虾摄食始终呈现旺盛势态,因此总体看该组对虾消化酶活性强于其他组。该结果与朱春华等提出的盐度14~22是凡纳滨对虾的最适生长盐度相符合^[23]。第5组盐度与钙镁等离子含量及比值均远偏离凡纳滨对虾原生活的自然海水与河口水水域,该组试验虾胰蛋白酶、胃蛋白酶活性均最低,在试验周期内该组试验虾摄食状况始终最差。第2、4组盐度分别为0.62%、0.22%,钙镁离子含量及比值分别达到海水与河口水的相应范围,在5个试验组中,这2组试验虾消化酶活性强度基本处于第1~3位。由此可见,养殖水中盐度、钙镁等离子含量影响凡纳滨对虾消化酶的活性。

3.2 盐度及钙镁离子含量对凡纳滨对虾免疫酶的影响

碱性磷酸酶(AKP)和酸性磷酸酶(ACP)均为磷酸单酯酶,对钙质吸取、骨骼形成、磷酸钙化、甲壳素分泌形成都具有重要作用,对虾在生长过程中要经历蜕壳过程,磷酸酶对于虾的生存具有特别重要意义,酸性磷酸酶是吞噬溶酶体的重要组成部分,在血细胞进行吞噬和包裹反应中,会伴随有酸性磷酸酶的释放^[27-28]。超氧化物歧化酶(SOD)是一类抗氧化酶,在机体免疫应答过程中起淬灭氧化剂的作用,与机体健康息息相关^[29]。

在本试验中,第1组(最高盐度组)和第5组(淡水组)试验虾的 AKP 和 ACP 活性均低于相应于河口水盐度(13)的第3组,表明盐度过高或过低都会对 AKP 和 ACP 活性产生不良影响。而第3组酶活性较高,表明对虾在生长过程中身体机能较好,受外界环境影响小,这与本试验各组的成活率及增长速度相符。在本试验结束后获取虾体样本时发现,第1组、第3组对虾甲壳上伤痕明显多于第5组,表明在受到机械性创伤后,高盐度组对虾有良好的调节机能,虾体成活明显提高。王维娜等报道罗氏沼虾在盐度14‰的环境中,碱性磷酸酶活性要显著高于盐度0.7‰和2.0‰^[7],本试验与之基本一致。第5组(淡水组)中 SOD 活性最高,而更高的 SOD 活性表明有更多的自由基需要去除,在低盐度下对虾体内自由基不断积累,如果未被及时清除而累积到很高的水平则会使虾体受到严重的氧化性损伤^[30],这也是低盐度组成活率为各试验组最低的原因之一。

溶菌酶是机体非特异性免疫因子之一,参与机体多种免疫反应,在机体正常防御功能和非特异性免疫中有保护机体生理平衡的作用。从各组试验虾溶菌酶活性检测结果可以看出,随着盐度升高溶菌酶活性升高,虾体溶菌活力增强,虾体免疫力得到提高。而通过第2、4、5组的比较发现,随着钙镁离子含量的降低,溶菌酶活性降低,但第4组与第5组差异不大,因此推测钙镁离子含量对溶菌酶活性影响主要由离子含量决定,与离子比例关系不大,盐度显著影响溶菌酶活性。

综合各种酶活性发现,第5组(淡水组)非特异性免疫能力最差,与其成活率最低相符;第3组酶活性较好,其生长成活也较好。李华等也通过研究证实,凡纳滨对虾免疫酶活性与养殖水体盐度密切相关,盐度18‰左右酶活性最高,盐度过高和过低都会降低其活性^[31]。

通过对比第2、4、5组数据可发现,其酶活性规律与第1、3、5组的规律略有差异:第2组酸性磷酸酶活性低于第5组。第2组对虾的成活率和生长速率低于第4组,略高于第5组,表明钙镁离子含量也必须要有合适的范围,含量过高或比例失调对凡纳滨对虾的生长会有抑制作用。刘存歧等研究表明,过高或过低的Ca²⁺质量浓度都会影响凡纳滨对虾的存活和生长,在Ca²⁺质量浓度为320 mg/L、Ca²⁺浓度/Mg²⁺浓度为1/2.5时,对虾存活与生长最佳,同时SOD和AKP酶活性也最高^[32]。

综上所述,盐度及钙镁离子含量对凡纳滨对虾消化酶及免疫酶活性有不同程度的影响,而河口水更适合凡纳滨对虾生长。建议在实际养殖中尽量选用半咸水的环境养殖凡纳滨对虾,或参考河口水钙镁含量调节养殖水的钙镁含量,这将对提高凡纳滨对虾的生长及存活有一定的促进作用。

参考文献:

[1] 迟淑艳,杨奇慧,周歧存,等. 南美白对虾幼体和仔虾淀粉酶和脂肪酶活力的研究[J]. 水产科学,2005,24(4):4-6.

[2] Moullac G L, Haffner P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea[J]. Aquaculture,2000,191(1/2/3):121-131.

[3] 潘鲁青,姜令绪. 盐度、pH突变对2种养殖对虾免疫力的影响[J]. 青岛海洋大学学报:自然科学版,2002,36(6):903-910.

[4] 房文红,来琦芳,王慧. 脱壳和盐度突变对中国对虾血淋巴渗透浓度和离子浓度的影响[J]. 水产学报,1999,23(增刊):22-27.

[5] Vargas - Albores F, Hinojosa - Baltazar P, Portillo - Clark G, et al. Influence of temperature and salinity on the yellow leg shrimp, *Penaeus californiensis* Holmes, prophenoloxidase system[J]. Aquaculture Research,1998,29:549-553.

[6] Cheng W, Chen J C. Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Fish & Shellfish Immunology,2000,10(4):387-391.

[7] 王维娜,孙儒泳,王安利,等. 环境因子对日本沼虾消化酶和碱性磷酸酶的影响[J]. 应用生态学报,2002,13(9):1153-1156.

[8] 房文红,王慧,来琦芳,等. 不同盐度对中国对虾血淋巴渗透浓度和离子浓度的影响[J]. 上海水产大学学报,1995,4(2):122-127.

[9] 王兴强,马牲,董双林. 凡纳滨对虾生物学及养殖生态学研究进展[J]. 海洋湖沼通报,2004(4):94-100.

[10] 刘恒,李光友. 免疫多糖对养殖南美白对虾作用的研究[J]. 海洋与湖沼,1998,29(2):113-118.

[11] 许国煊,梁友光,吴月嫦,等. 酵母葡聚糖对南美白对虾免疫功能的影响[J]. 饲料工业,2003,24(10):53-54.

[12] 戚兰,柯慧芬,郑春燕,等. 日本沼虾和南美白对虾免疫因子的比较研究[J]. 绍兴文理学院学报,2003,23(4):65-67.

[13] 陈昌福,姚娟,陈萱,等. 免疫多糖对南美白对虾免疫相关

酶的激活作用[J]. 华中农业大学学报,2004,23(5):551-554

[14] 臧维玲,江敏,戴习林,等. 杭州湾湾泾沿岸水化学状况[J]. 上海水产大学学报,2000,9(3):200-203.

[15] 蔡云龙,臧维玲,戴习林,等. 杭州湾湾泾沿岸水化学状况[J]. 上海水产大学,2002,11(3):219-224.

[16] 大连水产学院. 海水化学[M]. 北京:中国农业出版社,1986:20-22,355.

[17] 臧维玲,戴习林,徐嘉波,等. 室内凡纳滨对虾工厂化养殖循环水调控技术与模式[J]. 水产学报,2008,32(5):749-757.

[18] Dryer R L, Lata G F. Experimental biochemistry[M]. New York: Oxford University Press,1989:346-347.

[19] 北京大学生物系生物化学教研室. 生物化学实验指导[M]. 北京:人民教育出版社,1979:73-74.

[20] 刘玉梅,朱谨钊,吴厚余,等. 中国对虾幼体及仔虾消化酶活力及氨基酸组成的研究[J]. 海洋与湖沼,1991,22(6):571-575.

[21] 潘鲁青,王克行. 中国对虾幼体消化酶活力的试验研究[J]. 水产学报,1997,21(1):26-32.

[22] 黄凯,杨鸿昆,战歌,等. 盐度对凡纳滨对虾幼虾消化酶活性的影响[J]. 海洋科学,2007,31(3):37-40,45.

[23] 朱春华. 盐度对南美白对虾生长性能的影响[J]. 水产科技情报,2002(3):25-27

[24] Castille F L Jr, Lawrence A L. The effect of salinity on the osmotic, sodium and chloride concentrations in the hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus*[J]. Comp Biochem Physiol A,1981,68(1):75-80

[25] 沈丽琼,陈政强,陈昌生,等. 盐度对凡纳滨对虾生长与免疫功能的影响[J]. 集美大学学报:自然科学版,2007,12(2):108-113.

[26] Ponce - Palafox J, Martinez - Palacios C A, Ross L G. The effects of salinity and temperate on the growth and survival rates of juvenile white shrimp *Penaeus vanamei*, Boone, 1931 [J]. Aquaculture, 1997,157(1/2):107-115.

[27] Lai - Fook J. The structure of the haemocytes of *Calpodex ethlius* (Lepidoptera) [J]. Journal of Morphology, 1973, 139(1):79-103.

[28] Rowley A F, Ratchliffe N A. An ultrastructural and cytochemical study of the interaction between latex particles and the haemocytes of the wax moth *Galleria mellonella in vitro* [J]. Cell and Tissue Research,1979,199(1):127-137.

[29] 陈瑗,周玫. 自由基医学基础与病理生理[M]. 北京:人民卫生出版社,2002.

[30] Li E C, Chen L Q, Zeng C, et al. Comparison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph oxyhemocyanin contents and hepatopancreas histology of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at various salinities[J]. Aquaculture,2008,274(1):80-86.

[31] 李华,李强,曲健凤,等. 不同盐度下凡纳滨对虾血淋巴免疫生理指标比较[J]. 中国海洋大学学报:自然科学版,2007,37(6):927-930.

[32] 刘存歧,刘丽静,张亚娟,等. 基于卤水的养殖用水中Ca²⁺/Mg²⁺对凡纳滨对虾生长及体内SOD和AKP的影响[J]. 水产科学,2007,26(2):67-69.