

盐度对日本囊对虾仔虾生长发育和 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力的影响

潘鲁青 栾治华

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 青岛 266003)

摘要:研究了盐度对日本囊对虾仔虾 (*Marsupenaeus Japonicus*) 的生长发育和 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力的影响。结果表明, 盐度对日本囊对虾仔虾存活率、增重率和 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力的影响显著 ($P < 0.05$)。随着向低盐度变化的增加, 仔虾的存活率和增重率明显下降, 而向高盐度变化无显著差异; 在盐度变化 48h 内, 随着盐度变化的增加仔虾 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力变化增大, 各处理组仔虾 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力随着取样时间的增加呈峰值变化, 至 24h 时低盐度处理组酶活力达到最大值, 而高盐度处理组达到最小值; 至 48h ~ 72h 时, 不同盐度下仔虾 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力趋于稳定, 而且盐度越低酶活力越大。由此表明日本囊对虾仔虾在低盐度地下卤水中的适宜盐度为 20‰—24‰。

关键词: 盐度; 地下卤水; 日本对虾仔虾; 生长发育; $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$

中图分类号: S966.12 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2005)06-0699-05

近几年国内盐碱地对虾养殖业发展迅猛, 主要以低盐度地下卤水或淡水凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 养殖模式为主, 目前已大面积爆发严重的传染性“Taura”病毒病, 严重制约着盐碱地对虾养殖业的健康稳定发展。由于盐碱地养殖水环境离子组成、碱度等化学成分复杂、多变, 盐碱地对虾养殖面临的主要问题, 首先是对虾的养殖适应性, 其次是养殖水环境的调控和病害防治, 这些都与对虾的渗透调节生理方面直接相关, 而这方面的研究往往被忽视。日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 具有优良的养殖属性, 抗病力强, 适盐范围 15‰—35‰, 非常适宜于进行盐碱地地下卤水养殖, 国内外在这方面尚未见报道。本文研究了盐度对日本囊对虾仔虾生长发育和 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力的影响, 旨在探讨对虾的渗透调节机制, 从渗透生理方面分析盐碱地日本囊对虾养殖的可行性, 为盐碱地地下卤水日本囊对虾养殖提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料 实验于 2003 年 4 月在东营市东营区河蟹育苗场进行。实验用地下卤水采自盐碱地地下 40—50m, 盐度为 40‰。实验所用日本囊对虾仔虾购自东营市河口区对虾育苗场, 虾苗的生物体长为

0.8cm 左右。

1.2 实验用水指标的测定 用原子吸收分光光度计 (TAS-986)、精密比重计和酸度计分别测定自然海水、地下卤水和黄河淡水的离子浓度、比重 (换算成盐度) 和 pH。

1.3 盐度梯度的设置 实验用水为地下卤水与黄河淡水调配而成, 并添加分析纯氯化钾将实验用水的 Na^+ / K^+ 比值均调节为 30‰。盐度变化由盐度为 20‰的自然海水分别变化至 12‰、16‰、20‰、24‰的实验用水中, 并以自然海水组为对照组。实验分为生长发育和 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力实验两部分, 各实验梯度均设 3 个平行组。

生长发育实验在自制的控温箱内进行, 每个实验容器的水体为 500mL, 放入仔虾 10 尾, 不充气, 实验时间为 72h, 实验结束时计数仔虾的存活率和体质量日增重率。在实验开始、结束时, 分别取 3—5 尾仔虾用重蒸水冲洗 3 次, 60℃ 烘干至恒质量, 用万分之一电子天平称质量, 计算仔虾的体质量日增重率:

$$\text{体质量日增重率} (\mu\text{g} / \text{ind} \cdot \text{d}) = \frac{\text{终体质量} - \text{初体质量}}{\text{实验时间} \times \text{仔虾数量}}$$

$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力实验在 50cm × 40cm × 30cm 的塑料水槽内进行, 每个水槽分别放入仔虾

收稿日期: 2004-05-14; 修订日期: 2005-06-11

基金项目: 国家自然科学基金项目资助 (课题编号 30100140)

作者简介: 潘鲁青 (1966—), 男, 博士, 教授, 从事水产动物生理学的研究。E-mail: panlq@ouc.edu.cn

150—200 尾,连续充气,盐度突变后按 0、3、6、12、24、36、48、60、72h 进行取样,取样时从每个梯度各水槽随机捞取 10 尾仔虾置于 1.5mL 离心管中,并保存于 - 20℃ 冰箱中待测。

实验水温控制在 25±1℃,日换水 2 次,换水量为 1/2,并加入预先配置同温度同盐度的实验用水,换水前清除残饵、粪便及死虾,换水后投喂海跃牌对虾 0 号配合饲料。

1.4 Na⁺-K⁺-ATPase 活力的测定 取仔虾样品加入 5mL 预冷的提取液(10%蔗糖、5mmol/L EGTA、5mmol/L 组氨酸、pH 7.7),冰浴中用匀浆机在 18000r/min 转速下匀浆 5min,匀浆液在高速冷冻离心机中以 11000r/min 离心 30min,取上清液,然后再以 11000r/min 离心 10min,上清液保存于 - 4℃ 冰箱中,8h 内测定仔虾 Na⁺-K⁺-ATPase 活力。

Na⁺-K⁺-ATPase 活力的测定主要参考 Esmann 的方法^[1],通过测定 K⁺ 存在与不存在时(用乌本苷代替)ATP 释放出无机磷 Pi 量的差值来计算,Na⁺-K⁺-ATPase 活力单位用微摩尔无机磷/毫克蛋白/小时(μmolPi/mg/h)表示。

取 0.3mL 酶液在 0.8mL 培养介质中进行培养,K⁺ 存在组培养介质含 146mmol/L NaCl、22.5mmol/L KCl、4.5mmol/L MgCl₂、33.7mmol/L 组氨酸(pH 7.7),K⁺ 不存在(乌本苷存在)组培养介质含 168.7mmol/L NaCl、3.37mmol/L 乌本苷、4.5mmol/L MgCl₂、33.7mmol/L 组氨酸(pH 7.7)。在 40℃ 水浴中,所有试管均加入 0.1mL 27mmol/L Na₂ATP 反应 60min 后,

再加入 0.1mL 50%三氯乙酸(TCA)终止反应。取上清液用钼蓝法测定无机磷。酶蛋白含量参考 Bradford 方法^[2]测定。

1.5 数据分析 所有数据以 3 个重复组数据的平均值±标准差(Means±SE)表示,并采用单因素方差分析(ANOVA)和 Duncan 检验法统计分析。

2 结 果

2.1 养殖水源比重和离子组成的测定

表 1 养殖水源比重和离子组成的测定

Tab. 1 Measurement of density and ion concentration of underground brine water ,yellow river fresh water and sea water

水源 Source	比重 Density	盐度(%) Salinity	pH	Na ⁺ (mg/L)	K ⁺ (mg/L)	Na ⁺ /K ⁺
自然海水 Sea water	1.026	32	8.35	10760	387	27.8
地下卤水 Brine water	1.030	40	7.72	8725	108	80.70
黄河淡水 Fresh water	0.990	2	8.56	149	8.49	17.55

由表 1 可知,地下卤水的盐度较高,Na⁺、K⁺ 绝对含量与自然海水有差异,Na⁺/K⁺ 明显偏高,经用黄河淡水调配后盐度、pH 符合日本囊对虾养殖的要求,但 Na⁺/K⁺ 比值必须调节至与自然海水的接近(如 30%),才能保证对虾正常的生理机能。

2.2 盐度对日本囊对虾仔虾生长发育的影响

表 2 盐度对日本囊对虾仔虾存活率和增重率的影响

Tab. 2 The influence of salinity on survival rate and weight gain of japonicus postlarve

盐度(%) Salinity	12	16	20	24	海水(20) Sea water
存活率(%) Survival rate	36.7±3.33 ^a	66.7±4.97 ^b	76.7±6.67 ^b	70±3.33 ^b	80±5.77 ^b
体质量日增重率(μg/ind·d) Daily body weight gain	37.6±1.51 ^a	43.5±1.69 ^b	49.0±1.27 ^c	46.4±1.92 ^{bc}	50.1±0.58 ^c

注:数据右上角不同字母表示差异显著(P<0.05)。

由表 2 可以看出,盐度对日本囊对虾仔虾存活率和增重率有显著的影响(P<0.05)。与自然海水对照相比,随着向低盐度(20→16、12)变化的增加,仔虾的存活率和增重率明显下降,而向同等盐度和高盐度(20→24)变化无显著差异。

2.3 盐度对日本囊对虾仔虾 Na⁺-K⁺-ATPase 活力的影响

由图 1 可见,盐度对日本囊对虾仔虾 Na⁺-K⁺-

ATPase 活力的影响显著(P<0.05),且随着盐度变化的增加仔虾 Na⁺-K⁺-ATPase 活力变化增大,同时自然海水与盐度为 20%地下卤水处理组酶活力无显著差异。在盐度变化 48h 内,各处理组仔虾 Na⁺-K⁺-ATPase 活力随着取样时间的增加呈峰值变化,至 24h 时低盐度处理组酶活力达到最大值,而高盐度处理组达到最小值;至 48—72h 时,不同盐度下仔虾 Na⁺-K⁺-ATPase 活力趋于稳定,而且盐度越低

酶活力越大。

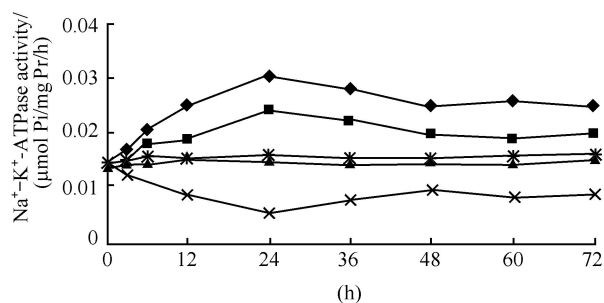


图1 盐度对日本囊对虾仔虾 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力的影响

Fig. 1 The influence of salinity on $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity of

Marsupenaeus japonicus postlarvae

◆12‰ ■16‰ ▲20‰ ×24‰ *Sea water

3 讨论

3.1 盐度对日本囊对虾仔虾生长发育的影响

盐碱地地下卤水具有盐度较高、碱度较大和水化学指标复杂易变等特点,依据本实验的测定结果,地下卤水的主要离子 Na^+ 、 K^+ 含量和 Na^+ / K^+ 与自然海水存在差异,要进行对虾养殖,养殖用水必须进行适当的离子和盐度调节。据吕富等^[3]报道随着低盐度地下卤水 Na^+ / K^+ 比值的降低(接近自然海水),凡纳滨对虾仔虾的存活率逐渐升高,而且不同的地下卤水的 Na^+ / K^+ 比值对仔虾存活率的影响存在差异。本研究表明地下卤水 Na^+ / K^+ 比值经适当调节后,随着向低盐度变化的增加,日本囊对虾仔虾的存活率和增重率明显下降,而向同等盐度和高盐度变化无显著差异,仔虾在低盐度地下卤水中的适宜盐度为 20—24。这与臧维玲等^[4]报道日本囊对虾幼虾在当盐度为 10.2‰—26.9‰ 时幼虾的生长效果最佳,盐度为 20.3‰ 时体长增长率和增重率最大的结果不完全一致,可能主要与地下卤水的化学组成的影响有关。Carlos Rosas 等^[5]认为当外界盐度发生变化时,白滨对虾 (*Litopenaeus setiferus*) 要消耗额外的能量来调节体内渗透压和离子浓度,以维持机体内环境的稳定;Dalla Via^[6]曾报道日本囊对虾从盐度 37‰ 移到到盐度为 10‰ 的环境中,耗氧率迅速提高到 300%,经数小时后稳定在 200% 的水平上。由此可见环境盐度变化破坏了对虾的渗透调节平衡,短时间内显著增加了耗氧量和能量需求,一旦超出对虾的渗透调节适应范围,则存活率下降,生长发育缓慢。作者认为地下卤水的离子和盐度调节是盐碱地对虾养殖的首要关键环节,还应考虑地下卤水中其他因子的作用以及不同地区地下卤水离子组

成的差异。因此,采用盐碱地地下卤水养殖日本囊对虾是完全可行的,建议放苗时盐度差应低于 4。

3.2 盐度对日本囊对虾仔虾 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力的影响

血淋巴中主要阳离子和阴离子的总浓度是很接近的,它们几乎决定了血淋巴渗透压水平,其中 Na^+ 和 Cl^- 是形成血淋巴渗透压的最主要贡献者^[7]; Wilder^[8]认为罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 血淋巴渗透压的变化主要取决于血淋巴中 Na^+ 浓度的变化。甲壳动物主要依靠鳃上皮细胞膜上的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 以主动运输的方式转运 Na^+ 和 K^+ , 从而维持机体的 Na^+ 、 K^+ 离子平衡和调节血淋巴渗透压。Furriel 等^[9]研究发现在淡水虾 (*Macrobrachium olfersii*) 鳃丝中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力占总的 ATPase 活力的 70%,剩下的 30% 对乌本苷不敏感的 ATPase 活力主要是 F_0F_1 -和 V-ATPases,而不是 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ 、 $\text{Na}^+ - \text{ATPase}$ 或 $\text{K}^+ - \text{ATPase}$; Bouaricha 等^[10]报道日本囊对虾从糠虾幼体后期到仔虾的转换时期体内 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力明显增加,与幼体发育从渗透压随变者到仔虾成为渗透压调节者相一致,而与成体不同的是仔虾的渗透调节的结构存在于鳃盖、胸膜和肢鳃上,鳃丝主要通过改变对水和离子的通透性间接调节渗透平衡。这说明 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力可以作为评价日本囊对虾仔虾对外界环境的渗透调节适应能力。

Lima 研究发现淡水沼虾从淡水转移到 21‰ 和 28‰ 海水中 20d 后测得的鳃丝 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力下降 35%^[11]; Lucu 等^[12]研究发现高渗调节类甲壳动物的血淋巴 Na^+ 离子浓度和外界水环境 Na^+ 离子浓度的差值与鳃丝 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性符合正相关性。本研究表明在实验时间内,自然海水 (20) 与盐度为 20‰ 地下卤水处理组日本囊对虾仔虾 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力无显著差异,同时随着盐度变化的增加酶活力变化增大,至 48—72h 时,不同盐度下仔虾 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力趋于稳定,而且盐度越低酶活力越大,这与上述结果基本一致。由此可见,经适当的离子调节,这种地下卤水完全符合日本囊对虾仔虾渗透生理的要求,而且盐度的变化未超出仔虾渗透调节适应范围,同时这个调节过程具有明显的时间规律性 (48h),与盐度变化值无关。许多学者认为在外界环境盐度变化后,短时间内甲壳动物体内 Na^+ 水平、生物胺和第二信使 (环状腺苷酸, cAMP) 含量的变化刺激已有的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, 使其活力迅速发生变化调节体内外离子浓度和血淋巴

渗透压达到渗透平衡,最终经过一段时间的适应,鳃丝细胞对水和离子的通透性发生改变, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力逐渐趋于稳定。由此作者认为由于地下卤水化学组成的复杂性,盐碱地对虾养殖应结合生长发育,全面分析对虾渗透生理的适应性,确定合理的离子和盐度调配方案,这对于提高我国盐碱地对虾健康养殖水平具有重要意义。

参考文献:

- [1] Esmann M. ATPase and phosphatase activity of $\text{Na}^+ , \text{K}^+ - \text{ATPase}$: molar and specific activity, protein determination [J]. *Meth. Enzymol*, 1988, 156: 105—115
- [2] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding [J]. *Anal Biochem.*, 1976, 72: 248—254
- [3] Lv F. The effects of Hyposaline underground brine water on the survival of *penaeus vannamei* Postlarvae [J]. *Qingdao Haiyang Daxue Xuebao*, 2002, 32 (123): 50—54 [吕富. 低盐度地下卤水对南美白对虾仔虾存活率的影响. 青岛海洋大学学报, 2002, 32 (123): 50—54]
- [4] Zang W L. Effects of salinity on growth and instantaneous oxygen consumption rate of juvenile *Penaeus japonicus* [J]. *Journal Of Shanghai Fisheries University*, 2002, 11, (2): 114—117 [臧维玲. 盐度对日本对虾幼虾生长与瞬时耗氧速率的影响. 上海水产大学学报, 2002, 11 (2): 114—117]
- [5] Carlos Rosas, Adolfo Sanchez. Dietary protein level on apparent heat increment and post-prandial nitrogen excretion of *Penaeus setiferus*, *P. schimitti*, *P. dnoraun* and *P. notialis* postlarvae [J]. *J of the World Aqua Socie*, 1996, 27 (1): 92—102
- [6] Dalla Via, G J. Salinity response of the juvenile shrimp *penaeus japonicus*. I. Oxygen consumption and estimations of productivity [J]. *Aquaculture*, 1986, 55: 297—306
- [7] Chen J C, Chia P G. Osmotic and ionic concentrations of *Scylla serrata* (Forskål) subjected to different salinity levels [J]. *Comp. Biochem. Physiol.* 1997, 117A: 239—244
- [8] Wilder M N, Ikuta K, Atmomarsono M, et al. Changes in osmotic and ionic concentrations in the hemolymph of *Macrobrachium rosenbergii* exposed to varying salinities and correlation to ionic and crystalline composition of the cuticle [J]. *Comp. Biochem. Physiol.* 1998, 119A: 941—950
- [9] Furriel R P M. Characterization of (Na^+ , K^+)-ATPase in gill microsomes of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 2000, 126: 303—315
- [10] Bouaricha N. $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and Carbonic anhydrase activities in larvae, postlarvae and adults of the shrimp *Penaeus Japonicus* [J]. *Comp. Biochem. Physiol.* 1991, 100A. (2): 433—437
- [11] Lima A G. Regulation of hemolymph osmolytes and gill $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activities during acclimation to saline media in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1997, 215: 81—91
- [12] Lucu C, Devescovi M, Skaramuca B, et al. Gill $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ in the spiny lobster *Palinurus elephas* and other marine osmoconformers. Adaptiveness of enzymes from osmoconformity to hyperregulation [J]. *J. Exp. Mar. Biol. Ecology.*, 2000, 246: 163—178

THE EFFECTS OF SALINITY ON DEVELOPMENT AND $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ ACTIVITY OF MARSUPENAEUS JAPONICUS POSTLARVAE

PAN Lu-Qing and LUAN Zhi-Hua

(The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003)

Abstract: The effects of salinity on development and $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity of *Marsupenaeus japonicus* postlarve were studied in order to discuss the osmoregulation mechanism of *Marsupenaeus japonicus* in this paper. It analyzed the feasibility that *Marsupenaeus japonicus* was cultured in saline-alkali area with view of osmotic physiology and provided the scientific basis of culturing *Marsupenaeus japonicus* using underground brine water.

In the test, underground brine water was diluted to the desired salinity levels of 12, 16, 20 and 24 with yellow river fresh water. Na^+ / K^+ in the water was adjusted to 30 with Potassium chloride (AR). And then Shrimps acclimatized in water of salinity 20 were put into these treatments. Groups of seawater served as the control groups. All trials were conducted in triplicates. In development test, survival rate and weight gain of *Marsupenaeus japonicus* postlarve was counted after 72 hours. Count the daily body weight gain of the larvae as follows:

$$\text{Daily body weight gain } (\mu\text{g/ind} \cdot \text{d}) = \frac{\text{final body weight} - \text{primal body weight}}{\text{Experiment time} \cdot \text{number of postlarves}}$$

In $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity test, the shrimps were sampled at 0h, 3h, 6h, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h and 72h. The samples were preserved in -20 °C. The $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ was determined by comparison between two media, one of which containing its specific inhibitor, ouabain (3mM), without K^+ according to the method of Esmann. The activity was expressed in micromoles of inorganic phosphate (Pi) per hr and per mg of protein. Protein was determined according to Bradford's method with bovin serum albumin (Sigma) as reference. All the results were given as average of three replicates data and analyzed by ANOVA and Duncan's Multiple Range Test.

Salinity had significant effects on survival rate, daily body weight gain and $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity of *Marsupenaeus japonicus* postlarve ($p < 0.05$). Survival rate and growth rate of postlarve decreased significantly with salinity decrease, while had no significant difference with salinity increased. The $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activities of seawater groups had no significant difference from groups of salinity of 30. And along with the salinity change increasing within 48h, the change of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activities of postlarves increased, activities of each treated group presented wave change, and was up to maximum in hyposaline-treated groups but up to minimum in hypersaline-treated groups till 24h. The $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity of postlarves tended to be stable from 48h to 72h, and was higher while salinity was lower. From above, it suggested that the feasible salinity of *Marsupenaeus japonicus* postlarve in hyposaline water was 20—24.

Key words: Salinity; Underground brine water; Growth; $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$