

低盐度胁迫对点带石斑鱼幼鱼消化酶、 抗应激酶和存活率的影响

余 燕^{1,2} 徐维娜² 刘兆普¹ 刘文斌^{2*}

(¹江苏省海洋生物学重点实验室 南京农业大学资源与环境科学学院, 210095)

(²南京农业大学动物科技学院, 210095)

摘要 探讨了低盐度胁迫对点带石斑鱼幼鱼消化酶、抗应激酶及幼鱼存活率影响。实验设计了 28.23、22.56、17.57、12.67 和 7.71 等 5 个盐度梯度, 实验鱼共 40 尾(体重 20 ± 2.32 g), 先放入盐度为 28.23 的水体中驯化 10 d, 然后按以上梯度逐级淡化, 在每个盐度梯度维持 3 d 后取样, 测定消化酶和抗应激酶等指标, 并观察其活动和存活状况。结果表明, 胃和肠的蛋白酶、淀粉酶活力随盐度梯度的下降显著降低($P < 0.05$); 肝脏、肌肉和肾脏的 SOD 活力随盐度梯度下降呈上升趋势, 肝脏、肌肉和肾脏的 CAT 和 GSH-Px 活力随盐度梯度下降呈降低趋势; 鱼的活动能力从盐度梯度为 17.57 时开始下降, 12.67 时即出现幼鱼死亡现象, 盐度梯度下降到 7.71 时, 幼鱼在 12 h 内全部死亡。说明低盐度胁迫将会严重影响点带石斑鱼幼鱼消化能力并导致鱼体自由基代谢紊乱, 应激增强, 最终将影响幼鱼健康生长。

关键词 点带石斑鱼幼鱼 盐度 消化酶 抗应激酶

中图分类号 Q959.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)04-0021-06

Effect of low salinity stress on activities of digestive and anti-stress enzymes, and survival rate of juvenile *Epinephelus malabaricus*

YU Yan^{1,2} XU Wei-na² LIU Zhao-pu¹ LIU Wen-bin^{2*}

(¹Key Laboratory of Marine Biology, Jiangsu Province College of Resources and Environmental Science, Nanjing Agriculture University, 210095)

(²College of Animal Science and Technology, Nanjing Agriculture University, 210095)

ABSTRACT Experiments were done to investigate the effect of low salinity stress on the digestive enzymes, anti-stress enzymes and the survival rate of juvenile *Epinephelus malabaricus*. The larvae were reared in seawater and the salinity was reduced from 28.23 to 22.56, 17.57, 12.67 and 7.71 successively in every three days. The digestive enzymes, anti-stress enzymes and the survival status were determined. The results showed that the protease and amylase activities in both stomach and intestines of the fish reduced significantly with the decrease of the salinity ($P < 0.05$). The activity of SOD increased, while CAT and GSH-Px in liver, muscle and kid-

江苏省海洋生物学重点实验室主任基金项目(JSK008-01)和江苏省水产三项工程项目(PJ2003-45、PJ2006-52)共同资助

* 通讯作者。E-mail: wbliu@njau.edu.cn, Tel: (025)84395382

收稿日期: 2008-07-12; 接受日期: 2008-10-28

作者简介: 余 燕(1985-), 女, 硕士, 主要从事海水健康养殖研究。E-mail: 2007103001@njau.edu.cn

ney declined with the decrease of the salinity. In addition, mortality appeared when salinity was 12.67, and all the juvenile fish died within 12 hours when the salinity was 7.71. Hence, the digestive enzymes and anti-stress system of juvenile *E. malabaricus* were affected seriously by low salinity stress and would ultimately affect the healthy growth of juvenile fish.

KEY WORDS *Epinephelus malabaricus* Salinity Enzyme activity
Anti-stress enzymes activities

点带石斑鱼 *Epinephelus malabaricus* 在海南、台湾、广东和福建等地俗称“青斑”，具有对环境适应性强、肉质鲜美和个体大等优点，是我国东南沿海重要的海水养殖对象。我国目前采用的石斑鱼养殖模式主要是浅海网箱养殖，受沿海变化无常的气候及地表径流等因素影响，养殖水体的盐度常常处于波动状态。石斑鱼养殖的难点之一是苗种培育，幼鱼对环境要求高，对盐度的适应性比成鱼更为狭窄。目前，有关盐度对鱼类生理生化影响，主要集中在渗透压调节(包括有关组织学变化)(Galat *et al.* 1998; Allan *et al.* 1992)、能量平衡(雷思佳等 1999)、耗氧率(雷思佳 2002)和氨排泄量等方面(Chen *et al.* 1995)，而对消化和抗氧化能力的研究，目前鲜有报道。本次试验通过逐步降低盐度梯度的方式研究盐度胁迫对石斑鱼幼鱼存活、消化和抗氧化力的影响，探索点带石斑鱼对低盐度的耐受范围，为今后开展点带石斑鱼规模性繁育和养殖，以及为将来工厂化养殖点带石斑鱼提供可靠的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验鱼

实验鱼为南京农业大学海南滩涂研究所养殖的点带石斑鱼幼鱼。幼鱼运回后在室内驯养 10 d，水温 25.0 ± 0.5 °C，盐度 28.5 左右，pH 随盐度变化为 7.7~8.2，挑选健康无病的幼鱼(20 ± 2.32 g)40 尾，随机置于水族箱(60 cm×55 cm)内，24 h 连续充气，确保溶氧大于 5 mg/L。驯化期间每日 8:00 和 16:00 投喂两次(10~15 g 海水小杂鱼切碎后投喂，投饵率 5%)。实验用水为曝气自来水与海水晶配制而成，逐步调到实验所需的盐度水平，驯化期间平均每天换水两次，每次换水 1/3。

1.2 实验设计

采用单因素实验设计，待幼鱼驯化已适应实验初始盐度后，每隔 3 日加入淡水，每次调低海水盐度约 5 左右(28.23、22.56、17.57、12.67 和 7.71)，直至幼鱼全部死亡为止。实验期间监测水质，水温 25.0 ± 0.5 °C，盐度 28.5，溶氧大于 5 mg/L，氨氮含量不超过 0.75 mg/L，除盐度变化外，其他水质指标基本保持不变，每日 16:00 投饵 1 次。每个盐度梯度(7.71 除外)取 3 尾鱼肝脏、肾脏和体侧肌肉采样，进行消化酶和抗应激酶活力测定。

1.3 粗酶液制备

取超低温保存的点带石斑鱼幼鱼肝脏、肾脏和体侧肌肉 0.5 g，加入 15 倍体积的磷酸钠缓冲液(pH 7.4，50 mmol/L)，用玻璃匀浆器冰浴匀浆，低温高速离心(4 °C，10 000 r/min，15 min)，上清液备用(杨 健等 2007)。

1.4 酶活性的测定

肠胃中蛋白酶活性单位定义为：每毫升胃液 37 °C 每分钟分解蛋白生成 1 μ g 氨基酸相当于 1 个酶活力单位。肠道中淀粉酶活性测定采用碘-淀粉比色法，单位定义为 100 ml 血清中的 AMS，在 37 °C 与底物作用 30 min，水解 10 mg 淀粉为 1 个单位。过氧化物歧化酶(SOD)活性的测定采用黄嘌呤氧化酶法，SOD 单位定义为

每毫克组织蛋白在 1 ml 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个 SOD 活力单位(U)。过氧化氢酶(CAT)活性单位定义为每克组织蛋白中过氧化氢酶每秒钟分解吸光度为 0.50~0.55 的底物中的过氧化氢相对量为 1 个过氧化氢酶的活力单位。谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性单位定义为每毫克蛋白质,每分钟扣除非酶反应的作用,使反应体系中 GSH 浓度降低 1 $\mu\text{g/L}$ 为 1 个活力单位。各酶活测定采用试剂盒(购自南京建成生物研究所)。

1.5 蛋白含量的测定

酶样蛋白含量测定采用考马斯亮兰法。用考马斯亮兰蛋白测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)测定,并制作牛血清白蛋白(BSA)标准曲线。

1.6 数据处理

数据用 SPSS13.0 软件统计,用单因子方差分析和 Duncan's 多重比较进行差异显著性检验,结果用平均值 \pm 标准差表示。

2 试验结果

2.1 点带石斑鱼幼鱼在低盐度胁迫下的活动能力和存活状况的观察

石斑鱼幼鱼在低盐度水体中活动能力和摄食能力持续降低。当水体盐度为 17.57 时,幼鱼的活动能力开始下降,主要表现为幼鱼多静卧缸底,游动迟缓,身体失衡,采食量逐渐减少。当水体盐度降为 12.67 时幼鱼不再采食,并有 4 尾幼鱼死亡。当盐度为 7.71 时,石斑鱼幼鱼全部死亡。具体情况见表 1。

表 1 不同盐度梯度下点带石斑鱼幼鱼活动和存活状况
Table 1 Activities of juvenile *Epinephelus malabaricus* at different salinities

盐度 Salinity	活动状况 Activity	摄食状况 Feeding	死亡状况 Mortality	死亡时间 Time of 100% mortality
28.23	活动正常 Normal	抢食 Feeding actively	无死亡 No mortality	—
22.56	活动正常 Normal	摄食减慢 Feeding slowly	无死亡 No mortality	—
17.57	游动迟缓 Slow movement	摄食减慢鱼食有剩 Feeding slowly with uneaten feed	无死亡 No mortality	—
12.67	迟缓及身体失衡 Slow movement and loss of balance	不摄食 No feeding	4 尾死亡 Death of four fish	72 小时内 Within 72h
7.71	—	—	全部死亡 Death of all fish	12 小时内 Within 12h

2.2 不同盐度梯度下点带石斑鱼幼鱼消化酶的变化

点带石斑鱼胃肠消化酶活性变化的结果见表 2。与水体盐度为 28.23 相比,石斑鱼幼鱼的胃蛋白酶肠活性随水体盐度下降降低且差异显著($P < 0.05$);肠淀粉酶活性也随水体盐度下降降低并且差异显著($P < 0.05$)。与水体盐度为 22.56 相比,当水体盐度为 17.57 和 12.67 时,胃蛋白酶肠活性和肠淀粉酶均显著降低($P < 0.05$);肠蛋白酶活性在盐度为 12.67 时下降显著($P < 0.05$)。其中胃淀粉酶未检测到。

2.3 不同盐度梯度下点带石斑鱼幼鱼抗应激酶的变化

点带石斑鱼幼鱼肝脏的抗应激酶活性变化的结果见表 3。与水体盐度为 28.23 相比,石斑鱼幼鱼肝脏中

SOD 活性随盐度下降升高并且差异显著 ($P < 0.05$); 石斑鱼幼鱼肝脏中 CAT 活性随盐度下降降低并且差异显著 ($P < 0.05$); 石斑鱼幼鱼肝脏中 GSH-Px 活性也随盐度下降降低并且差异显著 ($P < 0.05$)。

表 2 不同盐度梯度下点带石斑鱼幼鱼蛋白酶和淀粉酶比活力

Table 2 Activities of protease and amylase of juvenile *Epinephelus malabaricus* at different salinities

盐度 Salinity	胃 Stomach		肠 Intestine	
	蛋白酶 (U) Protease	淀粉酶 (u/dl) Amylase	蛋白酶 (U) Protease	淀粉酶 (u/dl) Amylase
28.23	153.77 ± 6.62 ^a	ND	11.66 ± 1.14 ^a	1.69 ± 0.03 ^a
22.56	138.47 ± 7.78 ^b	ND	7.88 ± 0.99 ^b	0.94 ± 0.08 ^b
17.57	125.69 ± 4.96 ^{bc}	ND	7.00 ± 1.09 ^b	0.50 ± 0.08 ^c
12.67	91.81 ± 10.39 ^c	ND	3.62 ± 0.24 ^c	0.26 ± 0.01 ^c

注: 同列(小写字母)中数据字母不相同者差异显著 ($P < 0.05$), 相同者差异不显著 ($P > 0.05$)

表 3 不同盐度梯度下点带石斑鱼幼鱼肝脏中 CAT、SOD 和 GPX-Px 比活力

Table 3 Activities of CAT, SOD and GPX-Px of juvenile *Epinephelus malabaricus* in liver at different salinities

盐度 Salinity	肝脏 Liver		
	SOD (U/mgprot)	CAT (U/mgprot)	GSH-Px (units/ml)
28.23	323.60 ± 3.49 ^a	171.39 ± 7.19 ^a	199.47 ± 0.66 ^a
22.56	336.90 ± 13.39 ^{ab}	140.52 ± 17.87 ^b	148.91 ± 20.83 ^b
17.57	350.21 ± 15.12 ^{bc}	142.40 ± 4.29 ^b	129.64 ± 12.35 ^b
12.67	369.29 ± 7.77 ^c	87.94 ± 3.95 ^c	127.98 ± 13.88 ^b

注: 同列(小写字母)中数据字母不相同者差异显著 ($P < 0.05$), 相同者差异不显著 ($P > 0.05$)

点带石斑鱼幼鱼肌肉的抗应激酶活性变化的结果见表 4。与水体盐度为 28.23 和 22.56 相比, 当水体盐度为 17.57 和 12.67 时肌肉中 SOD 活性显著升高 ($P < 0.05$), 石斑鱼幼鱼肌肉中 GSH-Px 活性随盐度降低下降并且差异显著 ($P < 0.05$), 而肌肉中 CAT 活力几乎未检测到。

表 4 不同盐度梯度下点带石斑鱼幼鱼肌肉中 CAT、SOD 和 GPX-Px 比活力

Table 4 Activities of CAT, SOD and GPX-Px in muscle of juvenile *Epinephelus malabaricus* at different salinities

盐度 Salinity	肌肉 Muscle		
	SOD (U/mgprot)	CAT (U/mgprot)	GSH-Px (units/ml)
28.23	63.67 ± 9.10 ^a	ND	129.32 ± 11.85 ^a
22.56	61.08 ± 7.24 ^a	ND	103.78 ± 8.43 ^b
17.57	81.87 ± 4.50 ^b	ND	79.84 ± 23.94 ^b
12.67	94.00 ± 14.42 ^b	ND	54.94 ± 4.47 ^c

肾脏中抗应激酶测试结果见表 5。石斑鱼幼鱼肾脏中 SOD 活性随盐度下降升高并且差异显著 ($P < 0.05$); 与水体盐度为 28.23 和 22.56 相比, 当水体盐度为 17.57 和 12.67 肾脏中 CAT 和 GSH-Px 的活性均显著降低 ($P < 0.05$)。

表5 不同盐度梯度下点带石斑鱼幼鱼肾脏中CAT、SOD和GPX-Px比活力

Table 5 Activities of CAT, SOD and GPX-Px of juvenile *Epinephelus malabaricus* in kidney under different salinity

盐度 Salinity	肾脏 Kidney		
	SOD (U/mgprot)	CAT (U/mgprot)	GSH-Px (units/ml)
28.23	79.6±5.87 ^a	1.350±0.171 ^a	60.370±15.4 ^a
22.56	105.13±8.38 ^b	1.397±0.125 ^a	67.37±6.38 ^a
17.57	108.79±13.94 ^b	0.987±0.069 ^b	25.02±8.73 ^b
12.67	135.54±12.92 ^c	0.473±0.147 ^c	21.68±4.93 ^b

注:同列(小写字母)中数据字母不相同者差异显著($P<0.05$),相同者差异不显著($P>0.05$)

3 分析与讨论

3.1 不同盐度对点带石斑鱼存活率的影响

曾文阳(1988)指出点带石斑鱼成鱼可以适应的盐度为11~41,在盐度11左右,应是低盐区一个很有意义的临界盐度梯度。在本实验中,当盐度调为7.71时,幼鱼全部死亡;盐度为12.67时,已有幼鱼死亡的情况;盐度为17.57时,幼鱼就出现不吃食状态,这说明幼鱼的低盐区临界盐度在8~13之间,盐度15以下,一些抵抗力较低的幼鱼就不能存活,因此在实际养殖过程中,盐度不能波动过大,应保持在20以上,否则将会对鱼苗的生长产生不利影响。

3.2 不同盐度对点带石斑鱼消化酶的影响

关于盐度对鱼类及其他海洋生物消化酶活性的影响报道甚少,很多研究者指出,盐度是通过影响动物的生理状态,如渗透压的调节来影响其消化酶活性(李希国等 2006)。内环境盐度高,机体需要排除多余的盐分,保持水分;内环境盐度低,机体需要摄取足够的盐分,排掉多余的水分(Bindu *et al.* 2002)。在这种渗透压主动调节过程中,还涉及到皮肤、肠道和肾脏等器官的参与(徐力文等 2007),鱼体需要消耗大量的能量,消化能力下降。蔡良候等(2003)报道,在海水盐度为20~32的范围内,鲷鱼仔鱼生长正常,其中盐度25~27组仔鱼生长情况略好,盐度高于32,则随盐度升高仔鱼生长趋缓,而盐度低于20,则随盐度降低仔鱼生长速度趋慢。还有学者认为无机离子是消化酶的激活剂或抑制剂,在不同浓度下,离子的影响程度也不同(李希国等 2006)。受这二重原因影响,鱼体的消化能力会随着低盐胁迫的加剧而逐渐降低,本实验的结果也证明了这一点,肠胃的蛋白酶活力和肠道的淀粉酶活力都随盐度的梯度下降而下降,但胃中的淀粉酶活力为零。导致这一的原因可能是鱼类淀粉酶主要是由胰腺分泌的,而胰液的出口处位于肠,有些鱼类的肠道中也可以产生淀粉酶(周景祥等 2001),而胃中的淀粉酶甚少。

3.3 不同盐度对点带石斑鱼抗应激酶的影响

对氧化酶活性的测定一般选取血液或肝脏。本文选择肌肉等代替血液主要是因为幼鱼较小,取血液困难。当盐度低于等渗点时,盐度越低,幼鱼的耗氧率增加会越显著,鱼体受应激产生过多活性氧自由基,而抗氧化酶活力升高有助于清除这些氧自由基,保护体内细胞免受氧化损伤(Filho *et al.* 1993)。王晓杰等(2005)对许氏平鲈的研究表明,许氏平鲈血液中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)的比活力随海水盐度降低呈逐渐上升趋势。Vig等(1989)研究了百草枯和缺氧以及二者的共同作用,发现鲤鱼肝脏、脑和鳃中的SOD活性都增大,本研究得到类似结果。文献指出SOD是一种特异性消除超氧自由基的循环酶,主要负责过氧化和噬菌作用造成的组织损伤的防御保护作用。SOD含量越高,说明有待清除的超氧自由基越多。长期的低盐胁迫导致鱼体内产生大量活性氧自由基,诱导了抗氧化酶比活力的升高。SOD可清除 $O_2^{\cdot-}$ 后产生 H_2O_2 ,过氧

化氢酶和 GPX 均可清除 H_2O_2 , 对机体起到保护作用, 3 种酶可组成相互保护的防御群体。Mather-Mihaiehan 等(1991)研究了造纸厂的废水对斑点叉尾鲴的影响, 发现肝中 CAT 活性的增长明显依赖于剂量和时间, 但其他的几种抗氧化性指标, 如 SOD 和 GPX 等的变化并不一致, 这也与本实验相对应, SOD 的提高充分说明急性盐度胁迫引起石斑鱼幼鱼的机体混乱, 产生了大量自由基, 同时破坏了鱼体内抗氧化酶之间的相互作用, 最终导致幼鱼损伤, 加速死亡。另外本实验中肌肉 CAT 活力的测试结果几乎为失活状态, 这可能跟肌肉中含此酶很少有关。

4 小结

盐度是影响鱼类生长的决定性环境因素之一。本实验发现低盐度胁迫将会使点带石斑鱼幼鱼体内自由基代谢紊乱, 应激增强, 消化酶活性降低, 最终将影响幼鱼健康生长。因此在养殖生产中应避免养殖水体盐度大幅度降低。

参 考 文 献

- 王晓杰, 张秀梅, 李文涛. 2005. 盐度胁迫对许氏平鲈血液免疫酶活力的影响. 海洋水产研究, 26(6): 137~142
- 李希国, 李加儿, 区又君. 2006. 盐度对黄鳍鲷幼鱼消化酶活性的影响及消化酶活性的昼夜变化. 海洋水产研究, 40~45
- 杨 健, 陈 刚, 黄建盛, 张健东, 施 刚, 汤保贵, 周 晖. 2007. 温度和盐度对军曹鱼幼鱼生长与抗氧化酶活性的影响. 广东海洋大学学报, 4: 25~29
- 周景祥, 陈 勇, 黄 权, 孙云农. 2001. 鱼类消化酶的活性及环境条件的影响. 华北大学学报(自然科学版), 2(1): 70~83
- 徐力文, 刘广锋, 王瑞旋, 苏友禄, 郭志勋, 冯 娟. 2007. 急性盐度胁迫对军曹鱼稚鱼渗透压调节的影响. 应用生态学报, 18(7): 1596~1600
- 曾文阳. 1988. 石斑鱼养殖学. 高雄: 前程出版社, 109~111
- 雷思佳, 叶世洲, 李德尚, 董双林. 1999. 盐度对台湾红罗非鱼能量收支的影响. 华中农业大学学报, 18(3): 256~259
- 雷思佳. 2002. 盐度与体重对台湾红罗非鱼耗氧率的影响. 应用生态学报, 13(6): 739~742
- 蔡良候, 林向阳, 温 凭, 叶金聪. 2003. 盐度对鳊鱼前期仔鱼生长与存活的影响. 福建水产, 1: 20~23
- Allan, G. L., and Maguire, G. B. 1992. Effects of pH and salinity on survival, growth and osmoregulation in *Penaeus monodon* Fabricius. Aquaculture, 107: 33~47
- Bindu, R. P., and Diwan, A. D. 2002. Effects of acute salinity stress on oxygen consumption and ammonia excretion rates of the marine shrimp *Metapenaeus monoceros*. Journal of Crustacean Biology, 22(1): 45~52
- Chen, J. C., and Nan, F. H. 1995. Oxygen consumption and ammonia-excretion of juvenile *Penaeus chinensis* at different salinity levels. Journal of Crustacean Biology, 68(6): 712~719
- Filho, D. W., and Boveris, A. 1993. Antioxidant defenses in marine fish-II. Elasmobranchs. Comp Biochem. Physiol. 106C: 415~418
- Galat, D. L., Post, G., and Keefe, T. J. 1998. Historical changes in the gill, kidney and liver of Labbontan cutthroat trout, (*Salmo clarki henshawii*), living in lakes of different salinity-alkalinity. Journal of Fish Biology, 27: 533~552
- Mather-Mihaiehan, E., and DiGiulio, R. T. 1991. Oxidant, mixed-function oxidase and Peroxisomal Responses in channel catfish exposed to bleached graft mill emuent. Arch. Environ. Contam. Toxicol.
- Vig, E., and Neemesok, J. 1989. The effects of hypoxia and Paraquat on the superoxide dimutase activity in different organs of carp, *Cyprinus carpiol*. J. Fish Biol. 35: 23~25