

温度对中华原钩虾(*Eogammarus possjeticus*) 摄食率和消化酶活力的影响*

薛素燕 毛玉泽 赵法箴 方建光^①

(农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 山东省渔业资源与生态环境重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 采用生理生态学和酶学分析方法,测定了不同温度下中华原钩虾的摄食率和消化酶活力。结果显示,温度对中华原钩虾幼体消化酶活力的影响差异极显著($P<0.01$)。在 15–25℃ 范围内,胃蛋白酶、类胰蛋白酶及淀粉酶的活力随培养温度的升高而增加;在 20–25℃ 范围内,胃蛋白酶、类胰蛋白酶和淀粉酶活力均处于较高水平,说明中华原钩虾幼体在此温度范围内具有较好的消化吸收能力。作为甲壳动物食性指标的淀粉酶/类胰蛋白酶活力(A/T)比值在 1.2–1.5 之间,说明此阶段中华原钩虾幼体偏植物食性。中华原钩虾日摄食率受温度影响显著($P<0.05$),在水温 20–25℃ 之间,中华原钩虾幼体具有最大摄食率,其回归方程为: $y = -0.754x^2 + 33.297x - 277.57$ ($R^2=0.958$),最大日摄食率为 89.84%。成体在 20℃ 左右达到日摄食率的最大值,其回归方程为: $y = -0.247x^2 + 10.463x - 78.287$ ($R^2=0.998$),最大日摄食率为 32.47%;中华原钩虾幼体和成体饵料吸收率均随温度升高呈先上升后下降的趋势,各温度处理组幼体的饵料吸收率均高于成体。根据饵料吸收率回归方程,可得到最大饵料吸收率,幼体为 59.86%,成体为 56.86%,对应的温度分别为幼体 21.30℃、成体 21.24℃。因此,20–25℃ 是培育中华原钩虾的适宜水温范围。

关键词 中华原钩虾; 温度; 消化酶活力; 摄食率

中图分类号 S96 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)04-0094-05

中华原钩虾(*Eogammarus possjeticus*)隶属于节肢动物门(Arthropoda)、甲壳纲(Crustacea),主要分布于中国渤海、黄海,常栖息于潮间带海藻间或岩石下(任先秋, 2002),是山东半岛潮间带及养殖池塘等端足类的优势种之一,是对虾、鱼类等经济水产动物的优质生物活饵。近年来,山东等地已出现规模化培养,但是关于该种的基础生物学方面的报道很少。规模化人工培养中华原钩虾首先要掌握各环境因子对其生长发育等生理学指标的影响,而温度较大程度控制着其生长发育。本研究对中华原钩虾在不同温度下主要消化酶活性以及摄食率、饵料吸收率进行了测定,试图从消化酶活力角度探索温度对中华原钩虾的生长以

及生理调节机制的抑制或促进作用,有助于确定中华原钩虾适宜的培育条件,为提高养殖产量提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

中华原钩虾连同与其生活的藻类群落一并以筛孔直径为 2 mm 的采样器于山东省青岛城阳上马镇浅海养殖池塘采集,转运至实验室自然海水暂养,水温为 10.23–13.12℃,盐度为 31–33, pH 为 7.74–8.03。

试验开始前,分别筛选个体大小均匀的雌、雄中华原钩虾培养。雄性体长为(16.98±0.66) mm,体重为

* 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022013022)资助。薛素燕, E-mail: xuesy@ysfri.ac.cn

^① 通讯作者: 方建光, 研究员, E-mail: fangjg@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-08-29, 收修改稿日期: 2014-10-16

(47.43±4.64) mg; 雌性体长为(12.26±0.66) mm, 体重为(33.41±5.70) mg。将同批次交尾雌雄体若干对移入培养箱(40 cm×40 cm×30 cm)中培养, 待交尾结束后, 将雄性移除, 挑选50只抱卵的雌性继续培养。待幼体孵出后, 将雌性中华原钩虾移除, 幼体备用。

1.2 幼体消化酶活力及蛋白含量测定

本试验设置15、20、25、30℃共4个温度梯度。实验开始时, 为避免剧烈温差对体长为(1.83±0.14) mm的受试中华原钩虾幼体造成伤害, 以驯养水温为基础, 以每2 h改变3℃的速率渐次升温至实验所需温度, 在各处理温度条件下适应3 d后开始试验, 试验持续7 d。试验容器为控温水族箱(20 cm×30 cm×20 cm), 水体9 L, 连续充气。在试验过程中, 每天08:00、12:00、16:00、20:00测水温, 校正培养箱温度, 每天换水约1/4, 新加入的海水预先调节至相应温度。

1.2.1 粗酶液的制备 试验结束后, 将试验中华原钩虾幼体饥饿24 h, 各组幼体分别取约0.2 g置于冰浴中, 加入10倍体积(W/V)预冷重蒸水, 在玻璃匀浆器中匀浆, 将匀浆物离心(TGL-16G型冷冻离心机)30 min (4℃, 10000 r/min)。上清液用于淀粉酶、胃蛋白酶和类胰蛋白酶活力测定, 保存于-80℃冰箱备用。

1.2.2 淀粉酶活性测定 加入以0.067 mol/L磷酸缓冲液(pH 6.9)配好的1%淀粉溶液0.5 ml, 中华原钩虾粗酶提取液0.5 ml, 摇匀后25℃水浴保温3 min; 加入2 ml指示剂(3, 5-二硝基水杨酸), 沸水浴中保温5 min, 取出迅速冷却, 定容至10 ml, 以酶标仪测定490 nm的吸光度, 计算麦芽糖的含量, 从而确定淀粉酶的活力。淀粉酶活性定义: 在25℃下, 每分钟催化淀粉生成1 μg麦芽糖为1个酶活力单位(μg/min)。

1.2.3 胃蛋白酶活性测定 胃蛋白酶活性测定参照刘玉梅等(1991)。在干燥的玻璃试管中, 加入0.5%干酪素溶液2 ml、0.04 mol/L EDTA-Na₂ 0.1 ml、0.2 mol/L柠檬酸缓冲液(pH 3.0) 0.4 ml、中华原钩虾粗酶液0.4 ml, 重蒸水定容至3.5 ml, 混匀后37℃水浴保温15 min, 加入30%三氯乙酸1 ml, 离心, 收集上清液, 以福林-酚试剂比色测定酪氨酸的生成, 确定胃蛋白酶活性。胃蛋白酶活性定义: 在37℃下, 每分钟水解干酪素产生1 μg酪氨酸为1个酶活力单位(μg/min)。

1.2.4 类胰蛋白酶活性测定 类胰蛋白酶活性测定基本同胃蛋白酶, 除将0.2 mol/L柠檬酸缓冲液(pH 3.0)换成0.05 mol/L硼砂-氢氧化钠缓冲液(pH 9.8)外, 其他步骤同胃蛋白酶活性测定相同。以福林-酚试剂比色测定酪氨酸的生成, 从而确定类胰蛋白酶活性。类胰蛋白酶活性定义: 在37℃下, 每分钟水解干酪素

产生1 μg酪氨酸为1个酶活力单位(μg/min)。

1.2.5 蛋白含量的测定 酶粗提液蛋白含量的测定采用考马斯亮蓝法, 根据Bradford的方法稍作改进。考马斯亮蓝G-250显色液的组成为0.01% (w/v)考马斯亮蓝G-250、5%(v/v)无水乙醇、10%(v/v)正磷酸。过滤后, 4℃避光保存。以牛血清蛋白(BSA)为标准蛋白(1 mg/ml)绘制蛋白浓度与OD值之间的标准曲线(表1), 然后取待分析的蛋白溶液于显色液中, 室温放置5 min后, 读取紫外可见分光光度仪上OD_{595 nm}值, 3次重复求平均值。

表1 工作液成分配比
Tab.1 Components of the working solution

| 溶液 Solution | 编号 Number | | | | | |
|-----------------------------------|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 100 μg/ml 标准蛋白 BSA (ml) | 0 | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| 0.15 mol/L NaCl (ml) | 1 | 0.9 | 0.8 | 0.7 | 0.6 | 0.5 |
| 考马斯亮蓝试剂 Bradford solution (ml) | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |

测定步骤: 摇匀, 1 h内以1号管为空白对照, 测定595 nm处比色值。以A_{595 nm}为纵坐标、标准蛋白含量为横坐标(10、20、30、40、50 μg), 绘制标准曲线。根据标准曲线, 得到线性回归方程: A_{595 nm}=aX+b。测出样品的A_{595 nm}, 利用标准曲线或回归方程求出样品蛋白质含量。最后, 按照标准曲线求得待分析样品溶液中蛋白的浓度, 计算样品蛋白浓度。

1.3 摄食率和饵料吸收率测定

本试验设置15、20、25、30℃4个温度梯度, 每个梯度设3个平行, 对照组未放置中华原钩虾。中华原钩虾设大[体长为(14.32±0.22) mm, 湿重为(36.62±5.35) mg]、小[体长为(7.83±0.11) mm, 湿重为(8.52±1.16) mg]两个规格, 大、小规格每个培养箱分别放30、50个。试验开始时, 以驯养水温为基础, 以每2 h改变3℃的速率渐次升温至实验所需温度, 在各温度条件下适应3 d, 试验进行14 d。试验容器为塑料箱(20 cm×30 cm×20 cm), 水体9 L, 连续充气, 每天换水约1/4, 新加入的海水预先调节至相应温度, 在试验过程中, 每天08:00、12:00、16:00、20:00测水温, 校正培养箱温度。每天10:00投喂新鲜绿藻浒苔 *Enteromorpha* sp. (2.09±0.07) g, 每次投喂之前, 采用虹吸法分别收集残饵及粪便, 仔细筛选、区分收集的粪便及残饵, 将未吃完的藻用滤纸吸干, 分析天平称重, 浒苔残饵量通过溶失试验进行校正。将粪便、残饵分别以锡箔纸包封, 70℃烘干24 h至恒重, 分析天平称重。同

时,将每个培养箱中的中华原钩虾用滤纸吸干后测定湿重。日摄食率、饵料吸收效率分别按如下公式计算:

$$\text{日摄食率(\%)} = \text{日摄食量(湿重)} \times 100 / \text{中华原钩虾湿重}$$

$$\text{饵料吸收率(\%)} = (\text{摄食量干重} - \text{排便量干重}) \times 100 / \text{摄食量干重}$$

1.4 数据统计与分析

运用 Excel 2010 和 SPSS 18.0 对实验数据进行统计分析。采用 ANOVA 单因子方差分析,并作 S-N-K 多重比较,以 $P < 0.05$ 作为不同处理间差异显著标准。

2 结果

2.1 蛋白质含量测定

测定酶粗提液 595 nm 的吸光度,利用标准蛋白质绘制的标准曲线(图 1),计算得到 15、20、25、30℃样品的蛋白质浓度分别为 3.18、3.19、4.18、3.46 mg/ml。

2.2 不同温度下中华原钩虾的消化酶活力

在 15–25℃ 范围内,中华原钩虾的胃蛋白酶、类胰蛋白酶及淀粉酶随培养温度的升高而呈现增加的

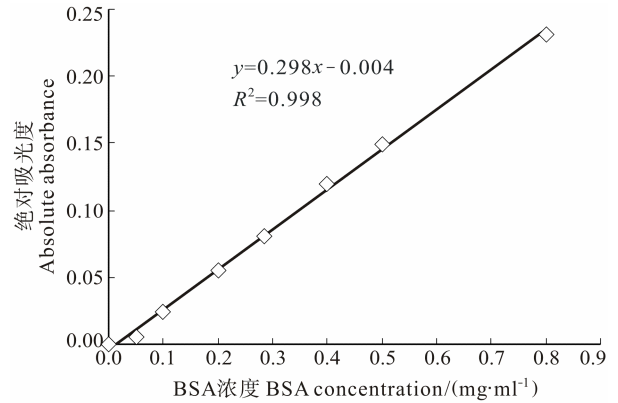


图 1 蛋白质含量的标准曲线
Fig.1 Standard curve for protein quantification

趋势(图 2),其中蛋白酶和类胰蛋白酶在 25℃ 时达到最大值,分别为 0.45、0.83 U/mg prot; 淀粉酶在 20℃ 时达到最大值,为 0.97 U/mg prot。但温度达到 30℃ 时,消化酶的比活力均出现较大降低。消化酶各温度处理组之间差异显著($P < 0.05$)。作为甲壳动物食性指标的淀粉酶/类胰蛋白酶活力(A/T)比值,在不同温度处理下波动较小,均在 1.2–1.5 之间。

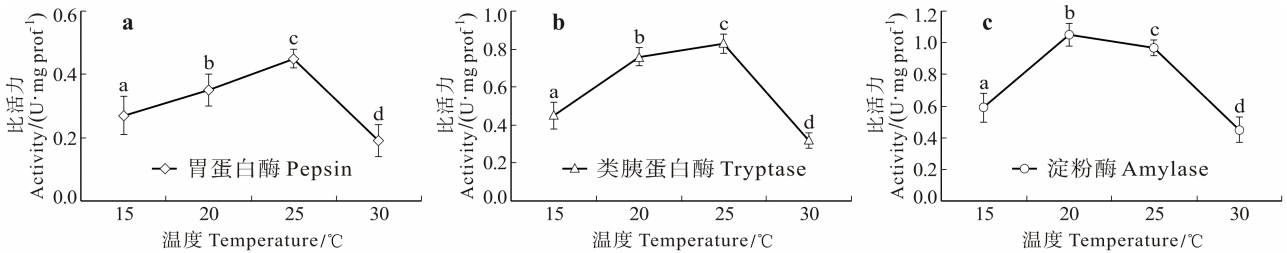


图 2 温度对中华原钩虾幼体消化酶活力的影响
Fig.2 Effects of temperature on the activities of pepsin, trypsin, and amylase of *E. possjeticus* larva

不同上标字母表示各处理组之间差异显著($P < 0.05$)

Different letters mean significant difference among treatments ($P < 0.05$)

2.3 不同温度下中华原钩虾的摄食率和饵料吸收率

中华原钩虾摄食率与温度的关系如图 3 所示,幼体和成体日摄食率随温度升高呈先升后降的趋势,各温度处理组幼体的日摄食率均高于成体,且各处理组间差异显著($P < 0.05$)。幼体日摄食率受温度影响较大,根据回归方程($y = -0.754x^2 + 33.297x - 277.57$, $R^2 = 0.958$)推出,在水温为 20–25℃ 范围内具有最大日摄食率,计算得到最大日摄食率为 89.84%;成体在 20℃ 达到最大日摄食率,根据回归方程($y = -0.247x^2 + 10.463x - 78.287$, $R^2 = 0.998$),计算得到最大日摄食率为 32.47%。

由图 4 可知,中华原钩虾幼体和成体饵料吸收率均随温度升高而呈现先升后降的趋势,各温度处理组

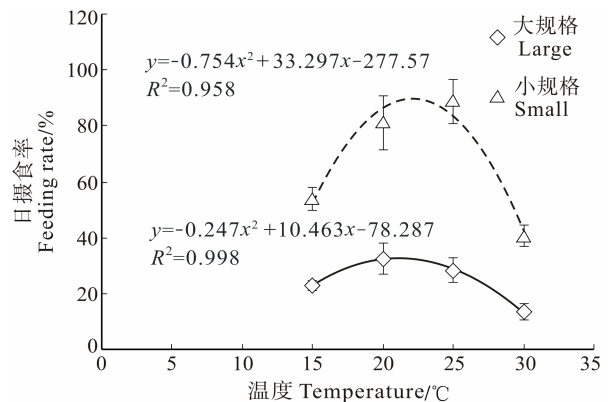


图 3 不同温度中华原钩虾的日摄食率
Fig.3 Feeding rate of *E. possjeticus* under different temperature

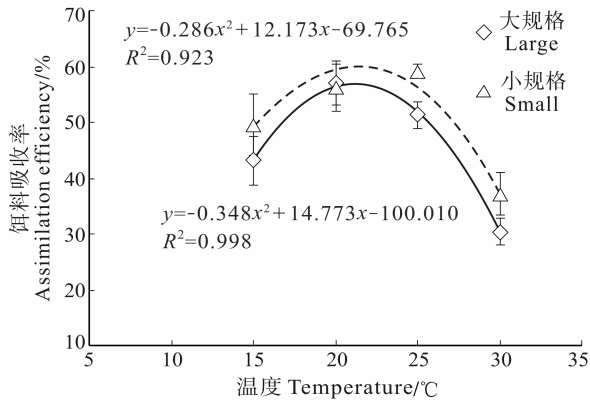


图4 不同温度中华原钩虾的饵料吸收率

Fig.4 Assimilation efficiency of *E. possjeticus* under different temperature

幼体的吸收率均高于成体,且各处理组间差异显著($P < 0.05$)。根据饵料吸收率回归方程,计算得到幼体、成体的最适饵料吸收的温度分别为 21.30°C 、 21.24°C ,最大饵料吸收率分别为 59.86% 、 56.86% 。

3 讨论

3.1 温度对消化酶活力的影响

动物的消化酶活力被认为是反映其消化机能的一项重要指标,决定着动物对营养物质消化吸收的能力,从而决定动物的生长发育速度。甲壳动物消化酶活力在营养生理方面有重要作用,直接影响甲壳动物的生长、蜕皮和摄食(van Wormhoudt, 1973; Lovett *et al.*, 1990; Galgani, 1985; van Wormhoudt *et al.*, 1988; Jones *et al.*, 1997)。消化酶属于蛋白质,温度是影响消化酶活力的最重要因素之一。研究表明,不同温度对中华原钩虾幼体消化酶活力有显著影响,在 $15\text{--}25^{\circ}\text{C}$ 水温范围内,随着温度的升高,中华原钩虾整体的呼吸代谢和能量消耗增加,对相关营养物质的需求也相应增加,中华原钩虾可能会调动其内在的补偿协调机制,加速对摄入食物中能量物质的分解和吸收,使消化酶活力增强。

不同消化酶活力的差别可以直接反映动物对不同营养物质吸收利用的能力。Biesiot 等(1990)提出采用淀粉酶活力/蛋白酶活力(A/P)或淀粉酶活力/类胰蛋白酶活力(A/T)的比值作为甲壳动物幼体的食性指标。比值高,则表示淀粉酶含量相对较高,该动物为植食性或偏植食性;比值低,则表示蛋白酶含量较高,为肉食性或偏肉食性。本研究中,中华原钩虾幼体的A/T值大于1,表明其淀粉酶活力较高,对淀粉具有较高的消化能力,为偏植物食性钩虾,这与潘鲁青等(2006)的研究结果一致。

国内外学者对甲壳动物消化酶活力的研究,尤其

是对幼体消化酶变化及摄食的研究也比较多,主要集中在对虾、龙虾、蟹等经济水产动物(杨蕙萍等, 1998; Biesiot *et al.*, 1990)。甲壳纲的白滨对虾(*Litopenaeus setiferus*) (Lovett *et al.*, 1990)、中国对虾(*P. chinensis*) (Bernfeld, 1955; 潘鲁青等, 1997a、b)和日本对虾(*P. japonicus*)、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)、锯缘青蟹(*Scylla serrate*) (潘鲁青, 1997)等消化酶的测定结果有一定的相似性,说明甲壳纲动物食性相近,其幼体发育过程中消化酶活力的变化具有类似的规律:摄食对象由浮游植物向浮游动物转化,同时伴随着淀粉酶活性的降低和蛋白酶活性的相应增加。研究发现,随着发育的进行,中华原钩虾的食性也发生一定转变,由植食性向杂食性转变。

3.2 温度对摄食率和饵料吸收率的影响

由于中华原钩虾属于变温动物,环境温度变化直接影响钩虾机体内的生理生化过程(杨蕙萍等, 1998),又由于酶催化反应的特性,温度直接影响消化酶的催化能力(陈昌生等, 2001),消化酶的催化速率直接影响钩虾对营养物质的消化、吸收和利用。在 $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$ 范围内,中华原钩虾的消化酶活力处于较高水平,对营养物质消化吸收较快,具有较高的摄食率和饵料吸收率,因而能够获得较快的生长速度。而当水温超过 25°C ,过高的水温抑制了消化酶的活力,致使其摄食和饵料吸收率降低,影响了中华原钩虾的正常生理机能,从而降低了生长速度,这与潘鲁青(1997)研究中国对虾幼体的结果相一致。

实验结果显示,中华原钩虾幼体的摄食率和饵料吸收率均高于成体,说明幼体的基础代谢速率更快,生长速度相应也高于成体。中华原钩虾幼体的最大摄食率和饵料吸收率对应的温度也高于成体,说明培育幼体的水温可以适当高于成体。水温 $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$ 范围内,中华原钩虾的摄食率和饵料吸收率均保持在较高水平,其胃蛋白酶、类胰蛋白酶和淀粉酶活力均处于较高水平,表明 $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$ 是培育中华原钩虾的适宜温度。

参 考 文 献

- 任先秋. 中国动物志. 北京: 科学出版社, 2002, 252
 刘玉梅, 朱谨钊, 吴厚余. 中国对虾幼体和仔虾消化酶活力及氨基酸组成的研究. 海洋与湖沼, 1991, 22(6): 571-575
 杨蕙萍, 童圣英, 王子臣. 国内外关于水产动物消化酶研究的概况. 大连水产学院学报, 1998, 13(3): 64-71
 陈昌生, 黄标, 叶兆弘, 等. 南美白对虾摄食、生长及存活与温度的关系. 集美大学学报, 2001, 6(4): 296-300
 潘鲁青, 马牲, 王克行. 温度对中国对虾幼体生长发育与消

- 化酶活力的影响. 中国水产科学, 1997a, 4(3): 17-22
- 潘鲁青, 王克行. 中国对虾幼体消化酶活力的试验研究. 水产学报, 1997b, 21(1): 26-31
- 潘鲁青. 四种虾蟹类幼体消化酶活力的比较研究. 青岛海洋大学学报, 1997, 27(3): 313-318
- 潘鲁青, 刘泓宇, 肖国强. 甲壳动物幼体消化酶研究进展. 中国水产科学, 2006, 13(3): 492-501
- Bernfeld P. Methods in Enzymology. New York: Academic Press, 1955, 149
- Biesiot PM, Capuzzo JM. Change in digestive enzyme activities during early development of the American lobster *Homarus americanus*. Mar Biol Ecol, 1990, 136(2): 107-122
- Galgani F. Radioimmunoassay of shrimp trypsin: application to the larval development of *Penaeus japonicus* Bate. Mar Biol Ecol, 1985, 87: 145-151
- Jones DA, Kumlu M, Vay LL, *et al.* The digestive physiology of herbivorous, omnivorous and carnivorous crustacean larvae: a review. Aquaculture, 1997, 155(1-4): 285-295
- Lovett DL, Filder DL. Ontogenetic change in digestive enzyme activity of larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus*. Biol Bull, 1990, 178(2): 144-159
- van Wormhoudt A, Favrel P. Electrophoretic characterization of *Palaemon elegans* (Crustacea, Decapoda) α -amylase system: study of amylase polymorphism during the intermoult cycle. Comp Biochem Physiol, 1988, 89(2): 201-207
- van Wormhoudt A. Variation des protéases, des amylases et des protéines solubles au cours du développement larvaire chez *Palaemon serratus*. Mar Biol, 1973, 19(3): 245-248

(编辑 冯小花)

Effects of Temperature on the Feeding Rate and the Digestive Enzymes Activities of *Eogammarus possjeticus*

XUE Suyan, MAO Yuze, ZHAO Fazhen, FANG Jianguang^①

(Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Shandong Provincial Key Laboratory of Fishery Resources and Ecological Environment, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

Abstract The amphipod crustacean *Eogammarus possjeticus* is an ideal live feed for fish and shrimp. However, little is known about the optimal aquaculture conditions for this species. Here we investigated the effects of temperature on the feeding rate and digestive enzymes activities of *E. possjeticus* using physiological ecology method and enzymatic analysis. Our results demonstrated that there were significant differences in digestive enzymes activities between groups treated at different temperatures ($P < 0.01$). In the range of 15–25°C the activities of pepsin, trypsin and amylase in *E. possjeticus* were elevated along with the increase of temperature, especially higher above 20°C. Thus, the optimal temperature for digestive enzymes activities should be 20–25°C. The amylase/trypsin (*A/T*) value was used to evaluate the feeding habits of crustacean. The *A/T* values were between 1.2 and 1.5 with small fluctuation, which indicated that the larvae of *E. possjeticus* had preference to plant diets. The feeding rate of *E. possjeticus* juveniles was largely affected by temperature ($P < 0.05$), and the predicted maximal feeding rate was 89.84% according to the correlation equation ($y = -0.754x^2 + 33.297x - 277.57$, $R^2 = 0.958$) between 20°C and 25°C. The predicted maximal feeding rate of adults was 32.47% according to the correlation equation ($y = -0.247x^2 + 10.463x - 78.287$ ($R^2 = 0.998$)) at around 20°C. The assimilation rates were similar between the juveniles and the adults of *E. possjeticus*. The maximal assimilation efficiency was 59.86% for juveniles, and 56.86% for adults, and the corresponding optimal temperatures were 21.30°C and 21.24°C respectively. These data suggested that 20–25°C could be an appropriate temperature range for the cultivation of *E. possjeticus*.

Key words *Eogammarus possjeticus*; Temperature; Digestive enzyme activities; Feeding rate

① Corresponding author: FANG Jianguang, E-mail: fangjg@ysfri.ac.cn