

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.19135

温度和盐度急性胁迫对岩牡蛎存活及免疫指标的影响

胡益鸣¹, 李琪^{1,2}, 刘士凯¹, 孔令锋¹

1. 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266237

摘要: 为探究岩牡蛎(*Crassostrea nippona*)对不同温度和盐度急性变化的适应性, 本研究通过将岩牡蛎从暂养环境(27 °C, 盐度 32) 直接转移至 5 个温度梯度(15 °C、19 °C、23 °C、31 °C、35 °C)和 6 个盐度梯度(16、20、24、28、36、40), 研究了急性胁迫对岩牡蛎超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、碱性磷酸酶(AKP)、溶菌酶(LSZ)活性、丙二醛(MDA)含量及存活的影响。温度实验结果显示, 15~31 °C 组岩牡蛎存活率均高于 71.11%, 35 °C 组存活率最低(34.44%), 而 15 °C 组免疫指标活性均受到明显抑制, MDA 含量在 144 h 时达到最大值(46.93 nmol/mg prot); 温度 19 °C、23 °C、31 °C 组 SOD、CAT、AKP 和 LSZ 活性及 MDA 含量受应激显著上升后均逐渐恢复至对照水平。盐度实验结果表明, 40 组盐度变化对岩牡蛎存活抑制明显, 显著低于其他处理组($P < 0.05$), 适宜岩牡蛎存活的盐度变化为 20~36 组; 盐度 16 组 SOD、CAT、AKP 和 LSZ 活性 144 h 时均显著低于对照组($P < 0.05$), MDA 含量与胁迫时间成正相关最终达到最大值(45.76 nmol/mg prot)。研究表明, 温度和盐度突变均会对岩牡蛎 5 项免疫指标和存活率产生显著影响, 岩牡蛎对温度 19~31 °C 组和盐度 20~36 组突变具有较强的适应能力。

关键词: 岩牡蛎; 温度; 盐度; 存活率; 免疫指标

中图分类号: S96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)03-0286-09

岩牡蛎(*Crassostrea nippona*)隶属于软体动物门、瓣鳃纲、牡蛎科、巨牡蛎属, 自然分布于日本、韩国和中国等东亚海区, 栖息于水深 5~15 m 的岩石底部^[1]。岩牡蛎的产卵期在 8—9 月, 相较于长牡蛎产卵期较晚, 即使在夏季岩牡蛎体内也保持着较高的糖原含量, 口感和营养价值都要优于长牡蛎, 因此常被视为长牡蛎夏季时期的替代品^[2]。巨大的市场潜力赋予了岩牡蛎极高的经济价值, 在日本岩牡蛎夏季的市场价格是长牡蛎的 5 倍之多^[3]。近年来, 国内学者不断尝试开展岩牡蛎人工养殖, 育苗技术也日趋完善, 但相关基础研究仍较匮乏。

中国牡蛎养殖主要集中在浅海, 夏季时常发生的持续高温以及降雨导致的地表淡水径流增加, 会引起近岸海域水温和盐度的大幅变化^[4]。剧烈

的物理应激会影响牡蛎的免疫功能, 造成血细胞吞噬活性和免疫酶活性的降低, 进而导致牡蛎成活率降低, 这也被认为是牡蛎夏季大规模死亡的原因之一^[5-6]。免疫相关酶活性是评估环境应激下贝类健康状态的重要指标^[7]。在近江牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)^[8]、虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)^[9]和魁蚶(*Scapharca broughtonii*)^[10]等研究中都已证实, 温度和盐度变化会对海洋贝类的免疫指标产生显著影响。极端温度和盐度胁迫会影响贝类的代谢及能量收支平衡, 降低机体对免疫防御的能量投入, 最终导致免疫相关酶活性下降, 进而影响贝类的生长存活^[8, 11]。因此, 温度和盐度的适宜变化是贝类维持正常免疫功能的重要前提, 对病害预防具有重要意义。

目前, 关于温度和盐度变化对岩牡蛎影响的

收稿日期: 2019-04-30; 修订日期: 2019-09-06.

基金项目: 山东省农业良种工程(2017LZGC009); 泰山学者种业计划专家项目.

作者简介: 胡益鸣(1995-), 男, 硕士研究生, 主要从事贝类遗传育种研究. E-mail: 1484103965@qq.com

通信作者: 李琪, 教授. E-mail: qili66@ouc.edu.cn

研究主要集中在幼虫及稚贝的生长存活等方面^[12-13], 尚未见有关环境因子对岩牡蛎免疫指标影响的报道。因此, 为探究温度和盐度急性胁迫对岩牡蛎存活及免疫指标的影响, 本研究采用温度和盐度突变处理, 测定了各实验条件下岩牡蛎超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、碱性磷酸酶(AKP)和溶菌酶(LSZ)活性与丙二醛(MDA)含量的动态变化及其存活率, 旨在为岩牡蛎的人工养殖提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料选用 2017 年构建的岩牡蛎养殖群体, 于 2018 年 8 月采自山东荣成养殖海域。在室内暂养 7 d, 暂养温度 27 °C, 盐度 32。从中随机挑选 100 个个体进行生长测量, 测得其壳高为(38.27±4.74) mm, 壳长为(29.75±5.19) mm。

1.2 实验设计

为分析岩牡蛎在温度和盐度急性胁迫下的存活变化, 从暂养环境(27 °C, 盐度 32)直接向 5 个温度处理(15 °C、19 °C、23 °C、31 °C、35 °C)和 6 个盐度处理(16、20、24、28、36、40)各转移 20 个个体, 每组均设置 3 个生物学重复, 实验持续 20 d, 每天记录各组岩牡蛎存活情况。

为分析温度和盐度急性胁迫对岩牡蛎免疫指标的影响, 将岩牡蛎从暂养条件(27 °C, 盐度 32)中迅速转移至各温度和盐度处理组, 进行 144 h 温盐突变胁迫, 分别于 0 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h、48 h、96 h、144 h 对各组岩牡蛎鳃组织进行取样, 以用于 SOD、CAT、AKP、LSZ 活性和 MDA 含量的检测, 每组每次随机选取 3 个个体。

1.3 指标测定

1.3.1 样品处理 将所取样品与匀浆介质(0.86%的生理盐水)以重量: 体积=1: 9 (g/mL)比例于匀浆管制成 10%的组织匀浆。之后 2500 r/min 离心 15 min, 取上清液进行相关免疫指标测定。

1.3.2 免疫指标测定 使用试剂盒(南京建成科技有限公司)和分光光度计检测 SOD、CAT、AKP、LSZ 活性及 MDA 和蛋白含量。SOD 活性测定原理是 O₂与羟胺反应产物经显色剂作用呈紫红色,

而 SOD 对 O₂专一性抑制, 利用实验组与对照组的吸光值差异, 即可计算出样品的 SOD 活性。CAT 测定原理是, 钼酸铵可迅速终止 CAT 分解 H₂O₂ 的反应, 剩余的 H₂O₂ 可与钼酸铵生成淡黄色的络合物, 测定吸光值即可计算 CAT 活性。MDA 会与硫代巴比妥酸(TBA)缩合生成红色产物, 在 532 nm 处检测吸光值可得 MDA 含量。AKP 分解磷酸苯二钠的产物经反应可生成红色醌衍生物, 根据颜色深浅可测得酶活性高低。LSZ 水解细菌细胞壁肽聚糖会导致细菌浓度降低, 进而使菌液透光度增强, 依据透光度变化即可得 LSZ 活性。蛋白浓度测定的原理是, 碱性环境中蛋白能将 Cu²⁺还原为 Cu⁺, Cu⁺与 BCA 试剂反应生成紫色络合物, 在 562 nm 处有最大吸收峰, 通过测定吸光值可知蛋白浓度。

1.4 数据分析

运用统计分析软件 SPSS 20.0 对存活及免疫指标进行单因素方差分析(one-way ANOVA)。组间差异采用 Duncan 多重比较分析, P<0.05 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 温度和盐度急性胁迫对岩牡蛎存活率的影响

随实验时间延长, 各温度组岩牡蛎存活率均呈下降趋势(图 1)。自第 8 天起, 各组存活率由大到小排序为 23 °C 组>19 °C 组>15 °C 组>31 °C 组>35 °C 组。自第 14 天起, 35 °C 组存活率开始低于 50% (48.89%), 而其他处理组存活率始终高于 70%。自第 15 天起, 15 °C 与 23 °C 组之间差异显著(P<0.05), 而 19 °C 组与 15 °C 和 23 °C 组均无显著性差异(P>0.05)。到第 20 天, 35 °C 组存活率最低(34.44%), 与其他各组差异极显著(P<0.01)。

与温度胁迫类似, 各盐度组存活率随时间延长逐渐下降, 但存活率均高于 70%(图 2)。自第 2 天起, 盐度 40 组存活率明显低于其他处理组。单因素方差分析表明, 自第 11 天起, 盐度 16、20 和 36 组均与 28 组存在显著差异(P<0.05)。在第 20 天, 40 组存活率降至最低(71.11%), 极显著低于其余处理组(P<0.01)。盐度 28 组存活率最高(92.22%), 与 16 组和 20 组差异显著(P<0.05), 与

24 组差异不显著 ($P>0.05$)。

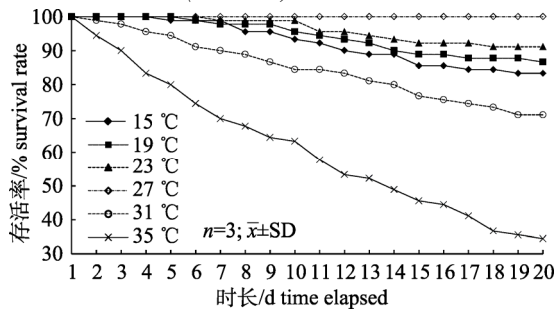


图 1 温度急性胁迫下岩牡蛎的存活率
Fig. 1 Survival rates of *Crassostrea nippona* exposed to acute temperature change

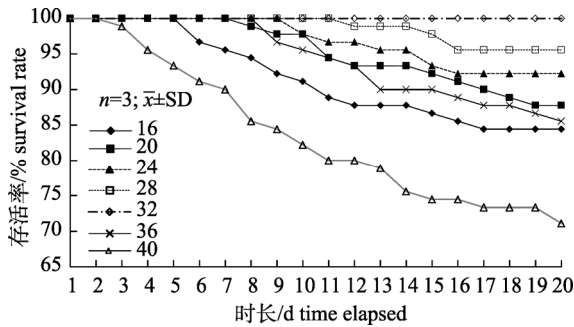


图 2 盐度急性胁迫下岩牡蛎的存活率
Fig. 2 Survival rates of *Crassostrea nippona* exposed to acute salinity change

2.2 温度急性胁迫对岩牡蛎免疫指标的影响

由图 3 可知, 15 °C 处理组 SOD 活性整体水平较低, 96 h 和 144 h 时酶活性显著高于其余实验组 ($P<0.05$)。经胁迫处理后, 19 °C、23 °C 和 31 °C 组随时间延长最终均恢复至对照水平, 其中 23 °C 组在 48 h 时达到最大值(272.50 U/mg prot)。而 35 °C 组前 12 h 均与对照无显著差异 ($P>0.05$), 24 h 后即显著低于对照组 ($P<0.05$)。

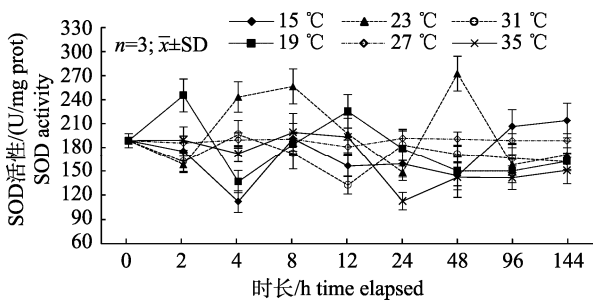


图 3 温度急性胁迫下岩牡蛎 SOD 活性的变化
Fig. 3 Changes of SOD activity in *Crassostrea nippona* exposed to acute temperature change

温度 15 °C、19 °C 和 23 °C 处理组 CAT 活性

均在 8 h 时达到峰值, 并随温度升高而上升(图 4), 其中 15 °C 组 CAT 活性在 96 h 和 144 h 时显著低于其他处理组 ($P<0.05$)。31 °C 组 CAT 活性变化大致呈先升后降趋势, 在 4 h 时即达到最大值(113.40 U/mg prot)。35 °C 组 CAT 活性在 48 h 时下降至对照水平, 随后在 96 h 和 144 h 出现显著上升。

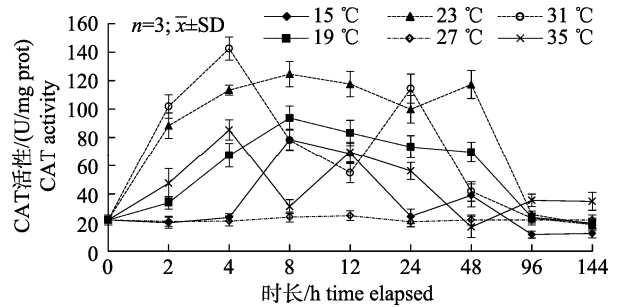


图 4 温度急性胁迫下岩牡蛎 CAT 活性的变化
Fig. 4 Changes of CAT activity in *Crassostrea nippona* exposed to acute temperature change

在 4 h 后, 15 °C 和 35 °C 组 MDA 含量均呈逐步上升趋势, 其中 15 °C 组在 144 h 时 MDA 含量达到最大值(46.93 nmol/mg prot)(图 5)。19 °C、23 °C 和 31 °C 组 MDA 含量随实验进行呈先升后降的变化, 其中 19 °C 和 23 °C 组 48 h 后均稳定至对照水平, 31 °C 组则在 24 h 时即与对照无显著差异 ($P>0.05$)。

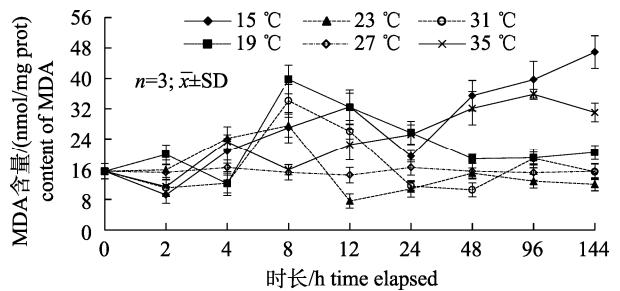


图 5 温度急性胁迫下岩牡蛎 MDA 含量的变化
Fig. 5 Changes of MDA content in *Crassostrea nippona* exposed to acute temperature change

实验结果显示, 随温度上升, 岩牡蛎 AKP 活性呈先上升后下降的趋势(图 6)。19 °C、23 °C 和 31 °C 组 AKP 活性较高, 在 2 h、12 h、24 h 和 144 h 时显著高于 15 °C 和 35 °C 组 ($P<0.05$)。15 °C 组除 12 h 外, 均显著低于对照组 ($P<0.05$)。35 °C 组 AKP 活性在 12 h 后也开始低处于较低水平, 最终

显著低于对照组($P < 0.05$)。

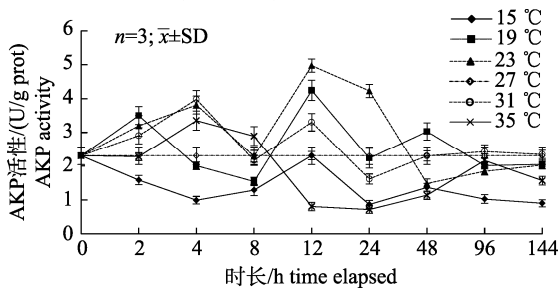


图 6 温度急性胁迫下岩牡蛎 AKP 活性的变化
 Fig. 6 Changes of AKP activity in *Crassostrea nippona* exposed to acute temperature change

实验中 15 °C 组 LSZ 活性变化幅度最大, 在 4 h 达到峰值(49.99 U/mg prot)并显著高于其余实验组 ($P < 0.05$), 而 12 h 时则降至最低水平(10.01 U/mg prot) (图 7)。温度 19 °C 组 LSZ 活性在 12 h 时达到最大值(58.99 U/mg prot), 之后逐渐恢复至初始水平。23 °C 与 31 °C 组 LSZ 活性呈先升后降趋势, 最终均与对照组无显著差异 ($P > 0.05$), 而 35 °C 组在 96 h 和 144 h 时 LSZ 活性均低于对照组。

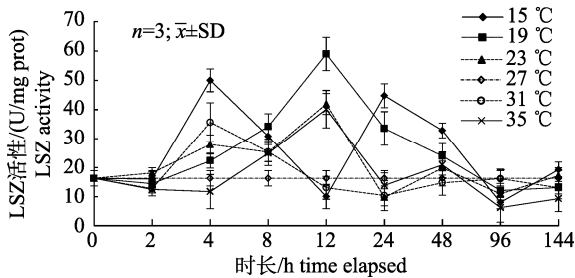


图 7 温度急性胁迫下岩牡蛎 LSZ 活性的变化
 Fig. 7 Changes of LSZ activity in *Crassostrea nippona* exposed to acute temperature change

2.3 盐度急性胁迫对岩牡蛎免疫指标的影响

盐度 28 和 36 组 2 h 时 SOD 活性即显著高于其余实验组 ($P < 0.05$) (图 8), 最终达到稳定并与对照差异显著 ($P < 0.05$)。而 16 盐度组 SOD 活性变化紊乱, 48 h 内酶活性出现重复性显著升降, 在 144 h 时显著低于对照和其余实验组 ($P < 0.05$)。盐度 40 组 SOD 活性变化趋势最为稳定, 在整个实验中均与对照组无显著差异 ($P > 0.05$)。

与 SOD 活性变化相似, 盐度 24、28 和 36 组 CAT 活性 2 h 时迅速上升, 并与对照和其余实验组差异显著 ($P < 0.05$) (图 9), 之后均逐渐恢复至初

始水平。而 16 组 CAT 活性较低, 在整个实验过程均未显著高于对照组 ($P > 0.05$)。4 h 后与其余实验组相比, 盐度 40 组 CAT 活性较高, 始终显著高于对照和其余实验组 ($P < 0.05$)。

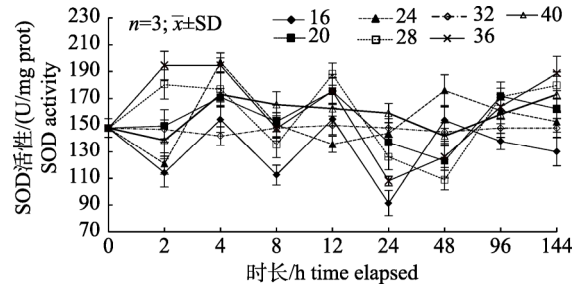


图 8 盐度急性胁迫下岩牡蛎 SOD 活性的变化
 Fig. 8 Changes of SOD activity in *Crassostrea nippona* exposed to acute salinity change

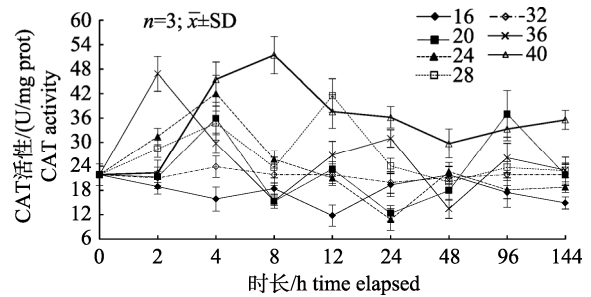


图 9 盐度急性胁迫下岩牡蛎 CAT 活性的变化
 Fig. 9 Changes of CAT activity in *Crassostrea nippona* exposed to acute salinity change

图 10 中, 16 盐度组 MDA 含量大致与时间呈正比, 144 h 时达到最大值(45.76 nmol/mg prot)。盐度 20、24、28 和 36 组均在 24 h 时出现峰值, 之后呈逐渐下降趋势, 其中仅 20 组 144 h 时 MDA 含量显著高于对照组 ($P < 0.05$)。随实验进行, 盐度 40 组 MDA 含量先上升后下降再上升, 最终显著高于除 16 组外的其他处理组 ($P < 0.05$)。

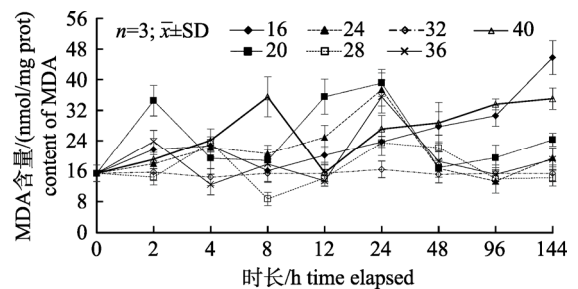


图 10 盐度急性胁迫下岩牡蛎 MDA 含量的变化
 Fig. 10 Changes of MDA content in *Crassostrea nippona*

exposed to acute salinity change

结果显示, 盐度 16 组 AKP 活性变化最为平缓, 实验过程中酶活性始终处于或低于对照水平(图 11)。盐度 20 组 AKP 活性逐渐上升, 于 12 h 时取得最大值(4.38 U/g prot), 之后呈下降趋势, 但仍显著高于对照组($P < 0.05$)。盐度 24、28 和 36 组在 96 h 时均恢复至对照水平。盐度 40 组岩牡蛎 AKP 活性在 4 h 时达到峰值(4.02 U/g prot), 之后在 48 h、96 h 和 144 h 时均显著低于对照组($P < 0.05$)。

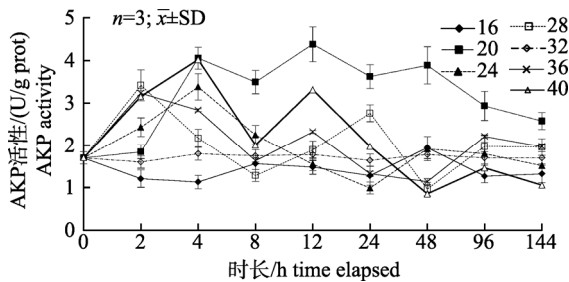


图 11 盐度急性胁迫下岩牡蛎 AKP 活性的变化

Fig. 11 Changes of AKP activity in *Crassostrea nippona* exposed to acute salinity change

各盐度组 LSZ 活性在 4 h 时均与对照存在显著性差异($P < 0.05$)(图 12)。实验过程中, 16 盐度组 LSZ 活性出现显著性波动, 但 LSZ 酶活性仍较低, 在 96 h 和 144 h 时均低于其他实验组。盐度 20、24 和 28 组 LSZ 活性最终均达到稳定, 并显著高于对照和其余实验组($P < 0.05$)。8 h 时盐度 40 组酶活性达到峰值(49.07 U/mg prot), 之后逐渐下降至对照水平。

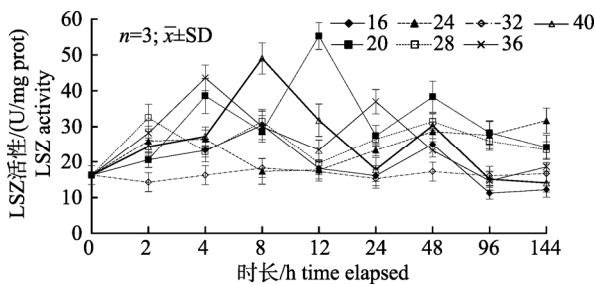


图 12 盐度急性胁迫下岩牡蛎 LSZ 活性的变化

Fig. 12 Changes of LSZ activity in *Crassostrea nippona* exposed to acute salinity change

3 讨论

双壳贝类对自身温度和渗透压的调节能力较差, 外界温度和盐度的不适或剧烈变化都会对其生理生化功能产生消极影响^[13-15]。学者研究这两个因素的相互作用时发现, 只有当其中一个因子接近极限范围, 另一个处于安全范围时, 两者才能表现出明显的相互作用^[16]。因此, 本实验通过采用单一变量的研究方法, 将其中一个因子控制在正常范围内, 也能够反映出温度和盐度分别对双壳贝类的影响。

3.1 温度和盐度急性胁迫对岩牡蛎存活率的影响

在温度实验中无论是升温组还是降温组, 随温度变化幅度增大, 岩牡蛎存活率均逐渐降低, 这与虾夷扇贝的研究结果相似^[17]。胁迫强度上升会加剧对贝类呼吸、摄食和免疫等功能的不利影响, 降低机体对环境的适应能力, 甚至引起死亡^[15, 18]。另一方面, 升温组存活率始终低于降温组, 表明岩牡蛎对高温突变的耐受性较差。有学者认为, 高温会造成贝类呼吸异常、免疫力下降及病菌滋生, 进而引起死亡^[19-20]。而 Wang 等^[13]研究发现, 岩牡蛎稚贝在高温下的存活率高于低温, 与本研究结果相悖。究其原因可能是处理方法不同, 温度突变可能比渐变处理对岩牡蛎存活率的影响更大, Hu 等^[21]在刺参(*Apostichopus japonicus*)的研究中也发现这一规律; 其次实验材料的规格差异也会影响机体对温度的耐受性, 本研究所用岩牡蛎[壳高为(38.27±4.74) mm]个体较大, 研究发现小个体的栉孔扇贝(*Chlymys farreri*)比大个体更耐高温^[16, 22]。总体而言, 15 °C、19 °C 和 23 °C 组存活率均高于 80%, 对温度变化的耐受性较强, 但是否适宜其生长发育仍需进一步研究。

在盐度胁迫中发现, 岩牡蛎在 20~36 组盐度变化下的存活率较高, 适宜岩牡蛎生存。盐度 16 组的存活率显著高于 40 组, 说明岩牡蛎对低盐变化的耐受性较高。牡蛎自然栖息于潮间带海区, 受降雨和河水等影响常经受海水盐度的大幅下降, 因此逐渐适应了低盐环境^[14]。此外随盐度上升及胁迫时间延长, 盐度 36 组和 40 组存活差异逐渐

扩大, 说明胁迫强度和持续时间均会影响岩牡蛎对盐度的耐受性^[23]。贝类为减轻盐度变化的影响, 会消耗大量能量来调节自身渗透压^[8], 胁迫时间及突变强度的上升可能会进一步增加这部分能量的消耗, 进而影响贝类存活。因此选择盐度适宜变化或变化周期较短的环境更有利于岩牡蛎的生存生长。

3.2 温度和盐度急性胁迫对岩牡蛎抗氧化指标的影响

逆境胁迫会导致生物体内的活性氧(ROS)大量积累, 过多的ROS会攻击生物细胞膜中的多不饱和脂肪酸, 引起脂质过氧化, 进而破坏细胞功能^[24]。抗氧化酶SOD和CAT能够清除动物体内的过量ROS, 对保持ROS代谢平衡和减轻氧化损伤起着重要的作用^[25]。此外MDA作为机体脂质过氧化产物, 其水平高低也常被用作衡量生物体氧化损伤程度^[9]。

本研究中升温与降温处理中SOD和CAT活性变化存在明显差异, 可能是升温 and 降温对岩牡蛎抗氧化酶活性的调控机制不同, 相似的现象在虾夷扇贝^[7]和杂交鲍(*Haliotis discus hannai* Ino)^[8]的研究中已有报道。15℃和35℃组抗氧化酶活性较低, MDA含量逐渐积累, 说明应激产生的ROS已超出机体的消除能力, 氧化损伤加重会引起机体生理功能缺陷, 进而影响其生长存活^[26], 这可能也是15℃和35℃组存活率最低的原因。与虾夷扇贝^[15]研究结果相似, 本研究中19℃、23℃和31℃组抗氧化酶活性和MDA含量均呈先升后降趋势, MDA含量的降低标志着生物对环境的适应过程^[26]。并且19℃、23℃和31℃组存活率也较高, 表明岩牡蛎对此范围温度变化的适应能力较强^[7]。

盐度实验中, 20~36组MDA含量经胁迫上升之后最终均恢复至对照水平, 对盐度变化表现出较强的适应能力。研究认为, MDA含量的变化与抗氧化酶对ROS的清除能力有关^[26]。盐度16组岩牡蛎抗氧化酶活性较低, MDA含量最终达到最大值; 盐度40组抗氧化酶活性较高, 但MDA含量最终仍显著高于对照组。说明无论低盐还是高

盐处理, 极端盐度变化产生的ROS均已超出抗氧化酶的清除能力^[27]。氧化应激产物的积累会导致贝类生理生化功能的缺陷, 影响其生长存活^[28]。

3.3 温度和盐度急性胁迫对岩牡蛎免疫酶活性的影响

在贝类简单的免疫系统中, AKP和LSZ均为溶酶体酶, 与吞噬细胞对异物的消灭和清除密切相关^[7]。此外LSZ还具有强力的抑菌作用, 通过溶解细菌细胞壁的肽聚糖使细菌崩解, 因此LSZ的活性大小常被用于衡量生物体的免疫状态^[28]。

Liu等^[29]和Chen等^[30]高温胁迫栉孔扇贝发现AKP活性仍保持在较高水平, 认为其原因与AKP理化性质有关。本研究中, 35℃组AKP在4h和8h时也显著上升, 而最终显著低于对照水平, 表明35℃组温度突变已引起AKP调节失衡, 岩牡蛎适应能力较差。在有关LSZ的研究中, Wang等^[31]研究刺参发现, LSZ活性随温度上升而提高; Paillard等^[19]研究菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)发现, 溶菌酶活性与温度呈负相关。本研究中LSZ活性与温度并无明显的变化规律, 与上述研究结果均不一致, 这一现象可能与研究动物的不同及实验方法的差异有关。温度15℃组中AKP和LSZ活性变化异常, 研究发现温度急剧降低会改变细胞膜对溶酶体酶的渗透性, 进而影响免疫酶的释放及其活性^[30]。Chu等^[32]研究发现, 美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)LSZ活性呈季节性变化, 冬季酶活性高于夏季。本研究中升温组LSZ整体活性较低, 这势必会影响机体的免疫功能, 降低对侵袭病菌的杀灭能力, 进而引起牡蛎高温死亡^[19]。

本研究中各盐度组AKP和LSZ活性均出现显著性上升, 这可能与牡蛎盐度胁迫下合成渗透休克蛋白的功效相似^[23], 均是机体对盐度应激的保护反应。盐度20~36组免疫酶活性最终均未低于初始水平, 说明盐度变化未超出机体免疫酶的承受限度。而随处理盐度降低, AKP和LSZ活性均在16组出现显著下降, 暗示16组盐度变化可能已接近岩牡蛎免疫酶承受临界点^[8]。免疫酶活性的下降也是引起岩牡蛎存活率下降的原因。

综上所述, 温度和盐度的急性变化均会对岩牡蛎免疫指标和存活率产生显著影响。温度 19~31 °C 组和盐度 20~36 组变化下岩牡蛎免疫调节灵敏迅速, 存活率较高, 表现出较强的适应能力。而长期极端胁迫会使其免疫调节紊乱, 氧化损伤程度加重, 存活率降低。因此在岩牡蛎养殖生产中, 应注意避开温盐长期大幅变化的海区。此外, 尤其在高温季节, 定期检测岩牡蛎抗氧化酶和免疫酶活性, 有助于了解机体的免疫能力和健康程度, 对养殖病害的防治和预警具有重要的意义。

参考文献:

- [1] Okutani T. *Marine Mollusks in Japan*[M]. Tokyo: University of Tokyo Press, 2000.
- [2] Li W J. *Biology and cultivation of oyster Crassostrea nippona*[J]. *Fisheries Science*, 2007, 26(12): 689-690. [李文姬. 岩牡蛎的生物学及其养殖[J]. *水产科学*, 2007, 26(12): 689-690.]
- [3] Itoh N, Tun K L, Komiyama H, et al. *An ovarian infection in the Iwagaki oyster, Crassostrea nippona, with the protozoan parasite Marteilioides chungmuensis*[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2004, 27(5): 311-314.
- [4] Durack P J, Wiffels S E, Matear R J. *Ocean salinities reveal strong global water cycle intensification during 1950 to 2000*[J]. *Science*, 2012, 336(6080): 455-458.
- [5] Gagnaire B, Frouin H, Moreau K, et al. *Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, Crassostrea gigas (Thunberg)*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 20(4): 536-547.
- [6] Malham S K, Cotter E, O'Keeffe S, et al. *Summer mortality of the Pacific oyster, Crassostrea gigas, in the Irish Sea: The influence of temperature and nutrients on health and survival*[J]. *Aquaculture*, 2009, 287(1-2): 128-138.
- [7] Jiang W W. *Effects of temperature variation on physiological activities of scallops and abalone*[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2017. [姜娓娓. 扇贝和皱纹盘鲍对温度变化的生理响应研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2017.]
- [8] Shi S K. *Studies on the immune parameters of mollusc stimulated by environmental factors*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013. [时少坤. 环境因子对贝类几种免疫因子影响的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.]
- [9] Jiang W W, Li J Q, Gao Y P, et al. *Effects of temperature change on physiological and biochemical responses of Yesso scallop, Patinopecten yessoensis*[J]. *Aquaculture*, 2016, 451: 463-472.
- [10] An M I, Choi C Y. *Activity of antioxidant enzymes and physiological responses in ark shell, Scapharca broughtonii, exposed to thermal and osmotic stress: Effects on hemolymph and biochemical parameters*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 155(1): 34-42.
- [11] Chen M Y, Yang H S. *Molluscan Ecological Immunology Review and Prospect*[M]// *Studia Marina Sinica*. Beijing: Science Press, 2007: 140-152. [陈慕雁, 杨红生. 贝类生态免疫研究进展[M]// *海洋科学集刊*. 北京: 科学出版社, 2007: 140-152.]
- [12] Wang T, Li Q, Zhang J X, et al. *Effects of salinity, stocking density, and algal density on growth and survival of Iwagaki oyster Crassostrea nippona larvae*[J]. *Aquaculture International*, 2018, 26(4): 947-958.
- [13] Wang T, Li Q. *Effects of salinity and temperature on growth and survival of juvenile Iwagaki oyster Crassostrea nippona*[J]. *Journal of Ocean University of China*, 2018, 17(4): 941-946.
- [14] Wang T, Li Q. *Effects of salinity and temperature on growth and survival of juvenile of Kumamoto oyster (Crassostrea sikamea)*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2017, 48(2): 297-302. [王涛, 李琪. 不同盐度和温度对熊本牡蛎(Crassostrea sikamea)稚贝生长与存活的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2017, 48(2): 297-302.]
- [15] Hao Z L, Tang X J, Ding J, et al. *Effect of high temperature on survival, oxygen consumption, behavior, ammonia-N excretion, and related immune indicators of the Japanese scallop Mizuhopecten yessoensis*[J]. *Aquaculture International*, 2014, 22(6): 1863-1876.
- [16] Tettelbach S T, Rhodes E W. *Combined effects of temperature and salinity on embryos and larvae of the northern bay scallop Argopecten irradians*[J]. *Marine Biology*, 1981, 63(3): 249-256.
- [17] Ben Y, Hao Z L, Ding J, et al. *Effects of high temperature on the immuno-enzymic activity in coelomic fluid of Mizuhopecten yessoensis*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(6): 858-863. [贲月, 郝振林, 丁君, 等. 高温对虾夷扇贝体腔液免疫酶活性的影响[J]. *水产学报*, 2013, 37(6): 858-863.]
- [18] Yu J H, Song J H, Choi M C, et al. *Effects of water temperature change on immune function in surf clams, Mactra veneriformis (Bivalvia: Mactridae)*[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2009, 102(1): 30-35.
- [19] Paillard C, Allam B, Oubella R. *Effect of temperature on defense parameters in Manila clam Ruditapes philippinarum*

- challenged with *Vibrio tapetis*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004, 59(3): 249-262.
- [20] Wang R C, Wang Z P. *Science of Marine Shellfish Culture*[J]. Qingdao: China Ocean University Press, 2008. [王如才, 王昭萍. 海水贝类养殖学[M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2008.]
- [21] Hu M Y, Li Q, Li L. Effect of salinity and temperature on salinity tolerance of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. *Fisheries Science*, 2010, 76(2): 267-273.
- [22] Yuan Y X, Qu K M, Chen J F, et al. Adaptability of *Chlymys farreri* to environment-effects of temperature on survival, respiration, ingestion and digestion[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2000, 7(3): 24-27. [袁有宪, 曲克明, 陈聚法, 等. 栉孔扇贝对环境变化适应性研究—温度对存活、呼吸、摄食及消化的影响[J]. 中国水产科学, 2000, 7(3): 24-27.]
- [23] Tirard C T, Grossfeld R M, Levine J F, et al. Effect of osmotic shock on protein synthesis of oyster hemocytes in vitro[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1997, 116(1): 43-49.
- [24] Ma X L, Zheng L W, Ye C X, et al. Effects of ghrelin on immune indexes of black seabream *Acanthopagrus schlegelii* under different salinity stress[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2018, 49(3): 692-699. [马细兰, 郑陆威, 叶超霞, 等. 胃促生长素 ghrelin 在不同盐度胁迫下对黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)部分免疫指标的影响[J]. 海洋与湖沼, 2018, 49(3): 692-699.]
- [25] Guo X M, He Y, Zhang L L, et al. Immune and stress responses in oysters with insights on adaptation[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 46(1): 107-119.
- [26] Dominguez M, Takemura A, Tsuchiya M. Effects of changes in environmental factors on the non-specific immune response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L[J]. *Aquaculture Research*, 2005, 36(4): 391-397.
- [27] Park M S, Jo P G, Choi Y K, et al. Characterization and mRNA expression of Mn-SOD and physiological responses to stresses in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Marine Biology Research*, 2009, 5(5): 451-461.
- [28] Xu Y J, Sun B. Effect of salinity stress on the growth, body composition and enzyme activities of juvenile *Hippocampus kuda*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(6): 1279-1285. [徐永健, 孙彬. 盐度胁迫对大海马(*Hippocampus kuda*)幼体生长、组分及酶活性的影响[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(6): 1279-1285.]
- [29] Liu S L, Jiang X L, Hu X K, et al. Effects of temperature on non-specific immune parameters in two scallop species: *Argopecten irradians* (Lamarck 1819) and *Chlamys farreri* (Jones & Preston 1904)[J]. *Aquaculture Research*, 2004, 35(7): 678-682.
- [30] Chen M Y, Yang H S, Delaporte M, et al. Immune responses of the scallop *Chlamys farreri* after air exposure to different temperatures[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2007, 345(1): 52-60.
- [31] Wang F Y, Yang H S, Gao F, et al. Effects of acute temperature or salinity stress on the immune response in sea cucumber, *Apostichopus japonicus*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2008, 151(4): 491-498.
- [32] Chu F L E, La Peyre J F. Effect of environmental factors and parasitism on hemolymph lysozyme and protein of American oysters (*Crassostrea virginica*)[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1989, 54(2): 224-232.

Effects of acute temperature and salinity stress on the survival and immune indexes of Iwagaki oysters, *Crassostrea nippona*

HU Yiming¹, LI Qi^{1, 2}, LIU Shikai¹, KONG Lingfeng¹

1. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education; Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China

Abstract: In this study, we evaluated the effects of acute temperature and salinity change on the survival and immune function of Iwagaki oysters (*Crassostrea nippona*). We measured the oysters' survival rates, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), alkaline phosphatase (AKP), and lysozyme (LSZ) activities, and their malondialdehyde (MDA) content after they were transferred to environments with five different temperatures (15 °C, 19 °C, 23 °C, 31 °C, and 35 °C) and six different salinity levels (16, 20, 24, 28, 36, and 40). In the temperature experiment, the minimum survival rate (34.44%) was observed at 35 °C and the survival rates of *C. nippona* were higher in other treatments. At 15 °C, the SOD, CAT, AKP, and LSZ activities were at low levels and the MDA content reached its highest value (46.93 nmol/mg pro). By contrast, the SOD, CAT, AKP, and LSZ activities and the MDA content in the treatment groups, reached their highest levels after acute temperature stress, then they decreased gradually to the control group level at 19 °C, 23 °C, and 31 °C. In the salinity experiment, the minimum survival rate (71.11%) was observed at a salinity level of 40, which was significantly different from other treatments ($P < 0.05$). The 20, 24, 28, and 36-acute treatment salinity levels were suitable for the survival of *C. nippona*. The SOD, CAT, AKP, and LSZ activities were significantly lower than the control group ($P < 0.05$) and the MDA content reached its highest value (45.76 nmol/mg pro) on salinity level 16 for 144 h. The results demonstrated that acute changes in temperature and salinity had significant effects on the SOD, CAT, AKP, and LSZ activities as well as on the MDA content and survival rate of *C. nippona*. Iwagaki oysters could adapt to seawater temperatures of 19 °C, 23 °C, and 31 °C-acute treatment and 20, 24, 28, and 36-acute treatment salinity levels.

Key words: *Crassostrea nippona*; temperature; salinity; survival rate; immune indexes

Corresponding author: LI Qi. E-mail: qili66@ouc.edu.cn