

高盐胁迫对缢蛏幼贝存活和三种酶活性的影响

曹伟^{1,2}, 迟长凤¹, 董迎辉⁴, 毕斯琦⁵, 刘志鸿^{2,3}, 孙秀俊^{2,3}, 周丽青^{2,3},
吴彪^{2,3}

(1. 浙江海洋大学 国家海洋设施养殖工程技术研究中心, 浙江 舟山 316022; 2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071; 3. 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 266071; 4. 浙江万里学院 浙江省水产种质资源高效利用技术研究重点实验室, 浙江 宁波 315100; 5. 天津农学院 天津市水产生态及养殖重点实验室, 天津 300384)

摘要: 为探讨高盐胁迫对壳长约 2 cm 缢蛏(*Sinonovacula constricta*)幼贝存活和酶活性的影响, 本研究设置盐度分别为 20‰(S₂₀)、25‰(S₂₅)、30‰(S₃₀)、35‰(S₃₅)、40‰(S₄₀)和 45‰(S₄₅) 6 个组别胁迫缢蛏, 测定各组幼贝死亡率, 并计算不同胁迫时间的半致死盐度(LC₅₀); 同时研究了 S₂₀、S₃₀ 和 S₄₀ 组幼贝软体部 Na⁺-K⁺-ATP 酶(NKA)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)三种酶在不同胁迫时间的活性变化特征。结果表明, 实验处理 120 h 后, 各组死亡率分别为 0、(2.17±0.85)%、(9.50±0.82)%、(30.67±3.70)%、(73.50±7.08)%和(94.67±3.06)%, 168 h 时 S₄₅ 组的缢蛏幼贝全部死亡; 直线内插法计算得到的 72、96、120、144、168 h 的高盐 LC₅₀ 分别为 46.03‰、39.85‰、35.77‰、34.57‰、33.69‰, 概率单位法得到的高盐 LC₅₀ 分别为 44.31‰、40.74‰、36.96‰、35.67‰、34.47‰。随着盐度升高和处理时间延长, NKA、AKP 与 ACP 活性总体上呈现先上升再下降后稳定的趋势, 三种酶活性变化趋势相似, 但效应时间不同, 盐度高于 30‰会給幼贝机体造成较大伤害, 能降低机体渗透压调节和免疫防御机能, 甚至导致死亡。研究结果为高盐条件下开展缢蛏科学养殖提供了参考数据。

关键词: 缢蛏(*Sinonovacula constricta*)幼贝; 高盐胁迫; 半致死盐度; 酶活性

中图分类号: S917.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2022)07-0044-08

DOI: 10.11759/hyxx20210725001

盐度是重要的环境因子, 显著影响水生生物的生存生长、能量代谢、渗透调节、免疫防御等多种生物学过程^[1-2]。由于全球变暖和人类活动的影响, 沿海生态环境因子经常发生变化, 给养殖生物带来不同程度的损伤^[3-5], 甚至死亡。多数双壳贝类移动能力较差, 机体对于盐度变化的调节适应尤为重要。当水体盐度变化时, 水生动物体内的生理过程都会发生明显的适应性改变^[6], 其中酶活力的变化可以有效反应机体变化状况。在这一过程中, Na⁺-K⁺-ATP 酶(NKA)能够发挥稳定细胞内外渗透压平衡和驱动离子逆浓度梯度跨膜主动转运的作用^[7-8], 其作用过程主要包括被动应激期、主动调节期、适应期^[9]。碱性磷酸酶(AKP)和酸性磷酸酶(ACP)是生物代谢的重要免疫类酶, 是动物体内解毒体系的重要组成, 参与磷酸基团的转移反应以及体内能量的收支平衡^[10], 是衡量机体免疫和健康状

况的重要指标。凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[10]、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)^[11]、近江牡蛎(*Crassostrea ariakensis*)^[12]等多种广盐性海洋无脊椎动物均有酶活力相关研究的报道, 且发现 NKA 在离子调控中发挥重要作用, 而 AKP 和 ACP 在盐度胁迫时的变化可引起体内机能协调失常、免疫防御能力降低。

缢蛏(*Sinonovacula constricta*)隶属于双壳纲、帘蛤目、竹蛏科, 常栖息于有淡水注入河口区的软泥底

收稿日期: 2021-07-25; 修回日期: 2021-12-29

基金项目: 宁波市科技创新 2025 重大专项(2019B10005, 2021Z114); 国家海洋水产种质资源库项目

[Foundation: 2025 Major Scientific and Technological Innovation Project of Ningbo, No. 2019B10005, No. 2021Z114; National Marine Genetic Resource Center Project]

作者简介: 曹伟(1996—), 男, 山东潍坊人, 硕士研究生, 研究方向: 贝类遗传育种, 电话: 17806275731, E-mail: 1824926985@qq.com; 吴彪, 通信作者, 副研究员, 电话: 18953206830, E-mail: wubiao@ysfri.ac.cn

质中,是我国传统的四大海水养殖贝类之一。目前,池塘混养已成为缢蛭养殖的重要模式之一。海水池塘水环境相对封闭,水环境因子变化较大,尤其夏天,干旱、高温等原因加速了蒸发速率,会导致养殖池塘的海水盐度不断上升。同很多双壳贝类一样,缢蛭的人工育苗和养殖也主要以室内育苗、室外中间培育和养成的分段式进行。一般情况下,稚贝壳长超过 600 μm 可移到室外进行中间培育,越冬后将中培后壳长 2 cm 左右的幼贝转移至池塘养成^[13-14]。此时的幼贝需适应池塘新环境,盐度的变化便是其中一个重要的因素,研究幼贝在高盐胁迫下的生存及生理变化尤为重要。

缢蛭适应盐度范围是 4‰~28‰,最适盐度范围是 10‰~20‰,蛭体大小不同,对盐度的适应能力略有不同,相对而言,小蛭更耐淡,大蛭更耐咸^[15]。魁蚶(*Scapharca broughtonii*)^[16]、近江牡蛎^[17]、菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)^[18]等贝类盐度耐受性的研究表明,成贝耐受盐度变化的能力普遍强于幼虫。林笔水等^[19-21]也曾研究了不同盐度下缢蛭生存、生长及发育状况,并发现长期生活在较高盐度海域的亲贝所繁衍的幼虫对高盐的耐受能力强于低盐耐受力,但尚未见壳长 2 cm 规格幼贝的相关研究。本文拟通过研究高盐胁迫下壳长约 2 cm 缢蛭幼贝的死亡率和 NKA、AKP、ACP 酶活性的变化,揭示幼贝在不同盐度环境下存活和生理适应变化情况,为缢蛭池塘养殖、高盐新品种(系)培育提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

获取烟台莱阳群体野生缢蛭亲贝,选择 2 000 粒壳长 5 cm 左右的缢蛭,人工繁育子代并养殖至壳长约 2 cm 用于实验。实验前,于实验室暂养 7 d,海水盐度 20‰,温度(20±1)℃,每天投喂等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)2 次,使水体中藻细胞浓度为 $2 \times 10^5 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$;同时每天换水 1 次,每次换水量为 1/2。

1.2 实验方法

行为观察及存活实验:实验设置 6 个盐度梯度,分别为 20‰(S₂₀)、25‰(S₂₅)、30‰(S₃₀)、35‰(S₃₅)、40‰(S₄₀)、45‰(S₄₅),其中 S₂₀ 为对照组。每组设置 3 个平行,每个平行 200 个个体。观察并记录幼贝行为状态,统计幼贝在胁迫 6、12、24、48、72、96、

120、144、168 h 共 9 个时间点的死亡个数,计算死亡率,并计算不同处理时间的半致死盐度 LC_{50} 。

酶活性实验:利用 NKA、AKP、ACP 试剂盒测定 S₂₀、S₃₀ 和 S₄₀ 幼贝在胁迫 6、12、24、48、72、96、120 h 后三种酶的酶活力。从各组中分别取 5 个幼贝的软体部用于 NKA、AKP、ACP 酶活力测定,蛋白定量测定盒(A045-4)、NKA 测试盒(A070-2)、AKP 测试盒(A059-2)、ACP 测试盒(A060-2)均购自南京建成生物工程研究所,实验步骤按照试剂盒说明书进行。

1.3 数据处理

利用 Excel 2019 进行统计和作图分析,采用 SPSS 26 通过直线内插法^[22]和概率单位法^[23]计算幼贝不同高盐胁迫时间的半致死盐度 LC_{50} ,Duncan 进行差异显著性检验, $P < 0.05$ 时差异显著。

2 结果

2.1 高盐胁迫对缢蛭幼贝行为及存活的影响

在适盐条件养殖下(S₂₀、S₂₅组),缢蛭始终保持旺盛活力,水管伸出,闭壳肌舒张,水体清澈无异味;在中、高盐度胁迫下(S₃₀、S₃₅组),水管少部分伸出,突然伸出斧足窜动的躁动现象频繁,水体散发淡腥味;在高盐度胁迫下(S₄₀、S₄₅组),缢蛭水管不再伸出,闭壳肌收缩,双壳紧闭,未有躁动现象,水体易浑浊。

缢蛭幼贝经不同盐度处理后的死亡情况如图 1 所示。结果显示,对照组始终没有出现死亡个体,说明实验幼贝健康状况良好;所有组的幼贝在胁迫 6 h 未有死亡,S₄₅ 组在胁迫 12 h 后最先开始出现死亡,各实验组死亡率随盐度升高和胁迫时间增长逐渐上升。同一时间点,死亡率具有随盐度升高而升高的趋势。S₂₅ 组与 S₃₀ 组实验期间死亡较少,死亡率始终显著低于其他各高盐组($P < 0.05$);S₃₅ 组死亡率缓慢均匀上升;S₄₀ 和 S₄₅ 组死亡情况严重,死亡率快速上升。72 h 后,各实验组死亡率分别为(1.00±0.82)%、(3.33±0.85)%、(12.83±2.78)%、(32.00±3.34)%、(51.67±4.09)%,且 S₂₅ 组与 S₃₀ 组与其他各实验组两两之间均存在显著性差异($P < 0.05$);至 120 h 时,各实验组死亡率分别达到(2.17±0.85)%、(9.50±0.82)%、(30.67±3.70)%、(73.50±7.08)%和(94.67±3.06)%,各实验组两两之间均存在显著性差异($P < 0.05$);168 h 时 S₄₅ 组的缢蛭幼贝全部死亡。

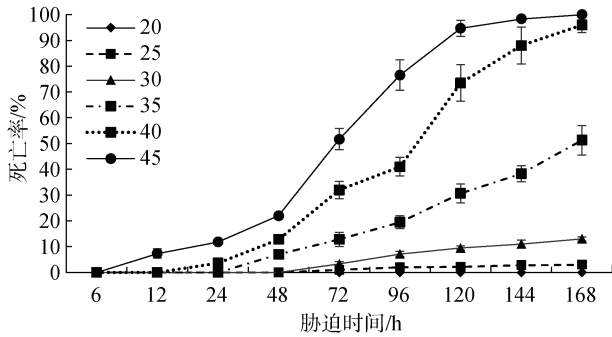


图1 缢蛏幼贝在不同盐度、不同胁迫时间的死亡率
Fig. 1 Mortalities of *S. constricta* juvenile at different salinities and treat-times

表1 直线内插法分析缢蛏幼贝半致死盐度

Tab. 1 Analysis of the salinity LC_{50} of *S. constricta* juvenile at different treat-times using the linear regression method

时间/h	回归方程	相关性系数	显著性 P	$LC_{50}/\text{‰}$	下限/ ‰	上限/ ‰
72	$y=40.77x+25.65$	0.83	0.00	46.03	38.93	53.14
96	$y=28.67x+25.52$	0.83	0.00	39.85	34.08	45.62
120	$y=21.90x+24.82$	0.88	0.00	35.77	31.58	39.95
144	$y=20.18x+24.48$	0.89	0.00	34.57	30.63	38.50
168	$y=19.43x+23.97$	0.90	0.00	33.69	30.05	37.32

表2 概率单位法分析缢蛏幼贝半致死盐度

Tab. 2 Analysis of the salinity LC_{50} of *S. constricta* juvenile at different treat-times using the probit analysis method

时间/h	回归方程	$LC_{50}/\text{‰}$	下限/ ‰	上限/ ‰
72	$y=0.12x-5.46$	44.31	43.53	45.21
96	$y=0.14x-5.88$	40.74	39.96	41.51
120	$y=0.19x-7.09$	36.96	36.15	37.65
144	$y=0.23x-8.32$	35.67	34.90	36.34
168	$y=0.28x-9.73$	34.47	33.87	35.00

2.2 高盐胁迫对缢蛏幼贝3种酶活性的影响

酶活实验结果表明,高盐对缢蛏幼贝的NKA活性存在明显影响(图2a)。对照组,幼贝NKA活性在不同处理时间基本处于稳定状态,无显著差异;S₃₀组,胁迫6 h后NKA活性显著上升($P<0.05$),且达到最高值(7.20 ± 0.75) U·mgprot⁻¹,活性约为对照组的150%,随后活性快速回落并趋于稳定;12 h内,S₄₀组与S₃₀组趋势相同,但S₄₀组24 h后显著上升,在48 h达到最大值(7.08 ± 0.24) U·mgprot⁻¹,也约为对照组的150%,之后回落并趋于稳定。6 h时,S₃₀和S₄₀组NKA活力显著高于对照组($P<0.05$);12 h和24 h时,S₃₀组NKA活力显著低于对照组和S₄₀组($P<0.05$),S₄₀组与对照组没有显著性差异($P>0.05$);48 h时,对照组与S₃₀组没有显著性差异($P>0.05$),但两者都显著低于S₄₀组($P<0.05$);72 h时,三组之间两两差异显

不同胁迫时间下,缢蛏幼贝线性回归方程相关数据以及盐度 LC_{50} 如表1所示,概率单位模型方程以及盐度 LC_{50} 如表2所示。结果表明,高盐胁迫时间越长,其半致死盐度越小。直线内插法计算所得幼贝在72、96、120、144、168 h的高盐度 LC_{50} 分别为46.03‰、39.85‰、35.77‰、34.57‰、33.69‰(表1);概率单位法计算所得缢蛏幼贝在72、96、120、144、168 h的盐度 LC_{50} 分别为44.31‰、40.74‰、36.96‰、35.67‰、34.47‰(表2),两种方法计算的缢蛏高盐 LC_{50} 结果相近,表明结果可靠。

著($P<0.05$),且S₃₀组活性最低,S₄₀组活性最高;96 h后,S₃₀和S₄₀组NKA活力显著低于对照组($P<0.05$)并在之后趋于稳定。

总体上,ACP活性呈现先升高后降低(图2b)。从图2b可以看出,对照组ACP活性未有显著性变化;S₃₀组,ACP活性总体较稳定,96 h后ACP活性显著下降($P<0.05$)并稳定;S₄₀组,ACP活性先上升,12 h最高(约为对照组的170%),之后下降,并在96 h后与S₃₀组活性相近。在同一时间点上,12 h时,S₄₀组ACP活性显著高于对照组和S₃₀组($P<0.05$);24、48和72 h时,S₄₀组ACP活性显著低于对照组和S₃₀组($P<0.05$);96 h后,S₃₀和S₄₀组ACP活力显著低于对照组($P<0.05$),并在之后趋于稳定。

缢蛏幼贝在高盐胁迫下AKP活性变化见图2c。对照组AKP活性稳定;S₃₀组自胁迫开始AKP活性就

呈下降趋势,在胁迫 24 h 时下降到最低($P<0.05$,且活性约为对照组的 60%),之后活性开始上升至稳定; S_{40} 组在胁迫 12 h 时 AKP 活性有小幅升高($P<0.05$),之后显著下降($P<0.05$),48 h 到达最小值(约为对照组的 80%),之后显著上升并稳定。胁迫 6 h 时,实验组和对照组 AKP 活性无显著性差异($P>0.05$);胁迫

12 h 和 24 h 时, S_{30} 、 S_{40} 组、对照组两两之间差异显著($P<0.05$),且 S_{30} 组 AKP 活性最小,但 12 h 时 S_{40} 组活性最高,24 h 时对照组活性最高;胁迫 48 h 时,两个实验组之间差异不显著($P>0.05$),但实验组活性显著低于对照组($P<0.05$);72 h 之后,三组之间差异不显著($P>0.05$)。

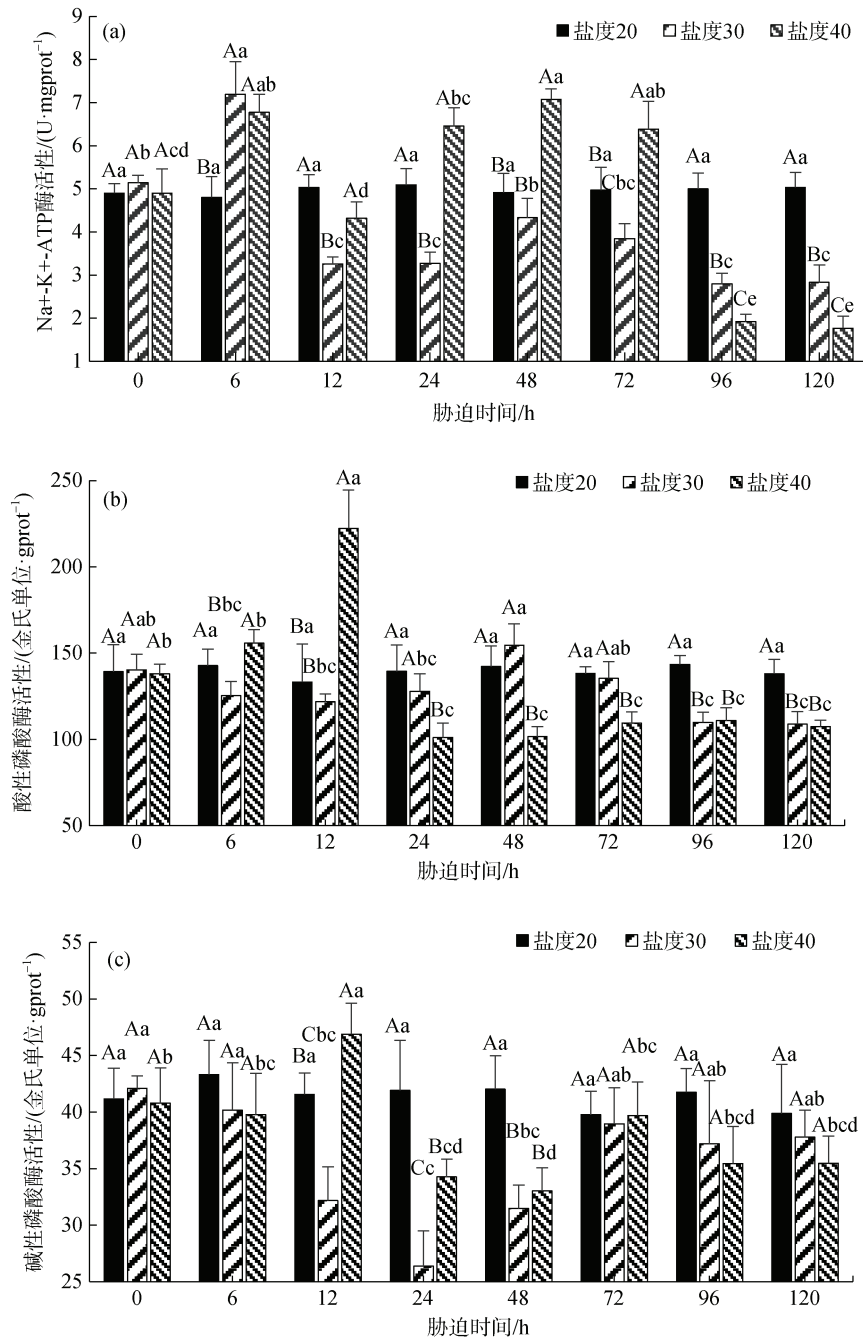


图 2 急性高盐胁迫对缢蛏幼贝三种酶活力的影响

Fig. 2 Effects of acute hypersaline stress on three enzyme activities of *Sinonovacula constricta* juvenile

注: (a), NKA 活性; (b), ACP 活性; (c), AKP 活性。图中不同大写字母代表同一时间下不同盐度组间的表达差异($P<0.05$), 不同小写字母代表同一盐度组不同时间下的表达差异($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 高盐对缢蛏幼贝存活状态的影响

缢蛏属于广盐适应种, 适应盐度范围是 4‰~28‰, 主要分布于河口地区。河口区水环境理化因子变化较大, 尤其是盐度的变化较为突出, 而盐度的骤变会引起机体相应的应激反应^[24], 影响生理状态和存活。前期的研究表明, 缢蛏幼虫(壳长约 130 μm)适盐范围为 4.5‰~28.3‰, 最适盐度为 12.4‰, 稚贝(壳长约 220 μm)的适盐范围与之相近^[19-21]。本研究发现, 壳长 2 cm 的幼贝受高盐胁迫后, 行为会发生明显变化, 盐度 45‰胁迫 12 h 时幼贝出现死亡, 且随着胁迫时间的延长, 死亡现象更加严重。尤其是 S₄₀ 和 S₄₅ 高盐度组, 168 h 的死亡率分别达到 96% 和 100%, 从死亡率上看出盐度超过 35‰就会对幼贝机体造成较大损伤。目前, 计算半致死值的常用方法有寇氏法、直线内插法和概率单位法^[22]。其中, 寇氏法简便有效、易于掌握, 但计算时应包含有死亡率为 0 和 100% 的组别, 所以有多个时间点不能满足寇氏法计算条件; 直线内插法和概率单位法因无太严格的条件限制, 应用简便而得到更广泛的应用。张广明等^[16]运用概率单位法计算了魁蚶低盐胁迫的半致死盐度; 彭茂潇^[25]使用直线内插法计算了不同规格缢蛏低盐的半致死盐度, 稚贝、幼贝、成贝的低盐 48 h LC₅₀ 分别为 1.45‰、1.29‰、0.75‰, 而本实验中运用概率单位法和直线内插法计算得到的缢蛏幼贝高盐 72 h 的 LC₅₀ 分别为 46.26‰和 44.31‰, 证明缢蛏拥有强大的渗透压调节能力。同时, 概率单位法和直线内插法计算得到的其他胁迫时间的高盐 LC₅₀ 结果相近, 说明研究结果较为可靠。

3.2 高盐对缢蛏幼贝 NKA 活性的影响

NKA 是 Na⁺/K⁺泵的重要活力成分, 对维持细胞中 Na⁺、K⁺稳态发挥重要作用^[26-27], 可以有效调节和维持机体渗透压^[28], 是盐度适应相关研究的重点。水生生物中有关 NKA 的研究有很多, Shui 等^[29]的研究发现斑尾复虾虎鱼(*Synechogobius ommaturus*)在高盐胁迫时 NKA 活性先上升, 在 12 h 达到峰值后下降, 很多鱼类的研究结果与之类似; 甲壳类的相关研究中, 江山等^[9]发现三疣梭子蟹在高盐胁迫时 NKA 活性先下降、后上升、再下降的趋势。本研究中, 缢蛏幼贝在高盐胁迫下 NKA 活性与成贝^[30]相同。盐度由 20‰转至 30‰时, NKA 活性呈现先上升后下降并逐

步稳定的趋势; 盐度由 20‰转至 40‰时, NKA 活性呈现先上升后下降再上升再下降的趋势。

当盐度发生骤变时, 缢蛏幼贝的 NKA 活性在短时间内发生大幅度波动, 推测是机体难以适应短时间内大幅度盐度变化的应激反应。高盐 6 h 后就出现 NKA 活性显著增加的情况, 可能使其适应了盐度由 20‰转至 30‰的变化, 但难以适应盐度 20‰转至 40‰的变化, 可能其自身难以维持长时间的 NKA 活性, 所以其 NKA 活性出现了波动的情况。值得注意的是, 96 h 后, 高盐组 NKA 活性显著低于对照组, 幼贝对高盐的适应能力有限。结合幼贝在高盐下的存活情况, 盐度 40‰应为缢蛏幼贝的耐受上限, 并且养殖池塘盐度最好低于 30‰。

3.3 高盐对缢蛏幼贝 ACP 和 AKP 活性的影响

由于软体动物缺乏免疫球蛋白, 所以其体液免疫主要是依靠血清中的一些非特异性的酶或因子来进行的^[31]。ACP 和 AKP 是软体动物溶酶体酶的重要组成部分, 在免疫反应中发挥作用^[32-33]。盐度胁迫造成贝类的血淋巴渗透压改变, 从而引起免疫系统的响应^[27]。有研究表明盐度的变化会造成软体动物各项免疫指标的变化, 例如血清总蛋白、氧合血红蛋白含量、AKP、酚氧化酶(PO)和超氧化物歧化酶(SOD)的含量, 从而降低生物体的免疫力^[34]。本研究显示, 高盐胁迫后 ACP 和 AKP 的活性变化不一致, 盐度 30‰胁迫的 ACP 活性没有显著性变化, 而盐度 40‰组 ACP 活性在胁迫 12 h 时显著性上升后降低并趋于稳定。可能是在盐度 30‰胁迫下, 其自身的调节并未影响内环境稳态, 所以其 ACP 活性没有显著性变化; 在盐度 40‰胁迫下, 造成其内环境失衡, 在胁迫 12 h 后, NKA 活性显著下降, ACP 活性显著上升来维持。实验结果与郑萍萍等^[11]对三疣梭子蟹的研究结果相似。高盐胁迫后 AKP 活性上升不显著, 这与时少坤等^[12]报道的近江牡蛎高盐组的血淋巴 AKP 活力变化结果相似, 这可能是河口贝类应对高盐的反应特征。而 Chen 等^[30]的报道中, 缢蛏成贝高盐胁迫(盐度 35‰)肝胰腺组织 AKP 活力在胁迫 12 h 后有显著上升, 这可能与不同组织或种群差异有关。盐度 30‰胁迫时, AKP 活性显著下降后上升, 并恢复到之前的活性, 可能在渗透压调节过程中其自身免疫机制会受到影响。实验结果表明, 缢蛏适应盐度 40‰难度较大, 但能适应盐度 30‰, 并且 24 h 内应为其

适应盐度 30‰的关键时间点,可能在适应过程中其他自身机制都会受到影响。本研究进一步丰富了缢蛏高盐胁迫相关的资料,为缢蛏养殖及高盐新品系的培育提供了参考资料。

参考文献:

- [1] VARGAS-CHACOFF L, SAAVEDRA E, OYARZUN R, et al. Effects on the metabolism, growth, digestive capacity and osmoregulation of juvenile of Sub-Antarctic Notothenioid fish *Eleginops maclovinus* acclimated at different salinities[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2015, 41(6): 1369-1381.
- [2] PECHENIK J A, BERARD R, KERR L. Effects of reduced salinity on survival, growth, reproductive success, and energetics of the euryhaline polychaete *Capitella* sp. I[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2000, 254(1): 19-35.
- [3] 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.
- [4] CARREGOSA V, FIGUEIRA E, GIL A M, et al. Tolerance of *Venerupis philippinarum* to salinity: Osmotic and metabolic aspects[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2014, 171: 36-43.
- [5] MUNARI M, MATOZZO V, MARIN M G. Combined effects of temperature and salinity on functional responses of haemocytes and survival in air of the clam *Ruditapes philippinarum*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30(4/5): 1024-1030.
- [6] 王怡, 胡婉彬, 李家祥, 等. 急性盐度胁迫对紫石房蛤(*Saxidomus purpurata*)鳃组织结构及 4 种酶活性的影响[J]. 中国农业科技导报, 2016, 18(5): 178-186.
WANG Yi, HU Wanbin, LI Jiaxiang, et al. Effects of acute salinity stress on gill structure and four enzyme activities in *Saxidomus purpurata*[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2016, 18(5): 178-186.
- [7] YANG W, HSEU J, TANG C, et al. Na^+/K^+ -ATPase expression in gills of the euryhaline sailfin molly, *Poecilia latipinna*, is altered in response to salinity challenge[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2009, 375(1/2): 41-50.
- [8] LIN C H, TSAI R S, LEE T H. Expression and distribution of Na, K-ATPase in gill and kidney of the spotted green pufferfish, *Tetraodon nigroviridis*, in response to salinity challenge[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2004, 138(3): 287-295.
- [9] 江山, 许强华. 盐度胁迫对三疣梭子蟹鳃 Na^+/K^+ -ATPase 酶活的影响[J]. 水产学报, 2011, 35(10): 1475-1480.
JIANG Shan, XU Qianghua. Influence of salinity stress on the activity of gill Na^+/K^+ -ATPase in swimming crab (*Portunus trituberculatus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(10): 1475-1480.
- [10] 张明明, 王雷, 王宝杰, 等. 凡纳滨对虾碱性磷酸酶和酸性磷酸酶基因的克隆、表达及盐度应答效应[J]. 海洋科学, 2017, 41(1): 83-95.
ZHANG Mingming, WANG Lei, WANG Baojie, et al. cDNA cloning and gene expression in response to Salinity of alkaline phosphatase and acid phosphatase from *Litopenaeus vannamei*[J]. Marine Sciences, 2017, 41(1): 83-95.
- [11] 郑萍萍, 王春琳, 宋微微, 等. 盐度胁迫对三疣梭子蟹血清非特异性免疫因子的影响[J]. 水产科学, 2010, 29(11): 634-638.
ZHENG Pingping, WANG Chunlin, SONG Weiwei, et al. Effect of salinity stress on serum non-specific immune factors in swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. Fisheries Science, 2010, 29(11): 634-638.
- [12] 时少坤, 王瑞旋, 王江勇, 等. 盐度胁迫对近江牡蛎几种免疫因子的影响[J]. 南方水产科学, 2013, 9(3): 26-30.
SHI Shaokun, WANG Ruixuan, WANG Jiangyong, et al. Effects of salinity stress on immune factors of *Crassostrea hongkongensis*[J]. South China Fisheries Science, 2013, 9(3): 26-30.
- [13] 金彬明. 缢蛏人工育苗及中间暂养技术[J]. 水产养殖, 2000, 2: 24-27.
JIN Binming. Study on artificial seeds production and spat culture of *Sinonovacula constricta*[J]. Journal of Aquaculture, 2000, 2: 24-27.
- [14] 周维武, 王海涛, 邢克敏. 缢蛏全人工养殖实用技术[J]. 齐鲁渔业, 2003, 8: 8-9.
ZHOU Weiwu, WANG Haitao, XING Kemin. Practical technology of artificial breeding of *Sinonovacula constricta*[J]. Shandong Fisheries, 2003, 8: 8-9.
- [15] 许振祖. 缢蛏[J]. 水产科技情报, 1977, Z3: 57-60.
XU Zhenzu. *Sinonovacula constricta*[J]. Fisheries Science & Technology Information, 1977, Z3: 57-60.
- [16] 张广明, 吴彪, 杨爱国, 等. 盐度胁迫对魁蚶耐受性及体内酶活性的影响[J]. 鲁东大学学报(自然科学版), 2017, 33(2): 159-163.
ZHANG Guangming, WU Biao, YANG Aiguo, et al. Influence of low salinity challenge on survival and enzyme activities in *Scapharca broughtonii*[J]. Journal of Ludong University (Natural Science Edition), 2017, 33(2): 159-163.
- [17] 薛凌展, 阙华勇, 张国范, 等. 盐度对近江牡蛎幼虫

- 生长及存活的影响[J]. 海洋科学, 2007, 31(9): 73-77.
XUE Linzhan, QUE Huayong, ZHANG Guofan, et al. The effect of salinity on growth and survival of *Crasostrea rivularis* larvae[J]. Marine Sciences, 2007, 31(9): 73-77.
- [18] 范超, 温子川, 霍忠明, 等. 盐度胁迫对不同发育时期菲律宾蛤仔生长和存活的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2016, 31(5): 497-504.
FAN Chao, WEN Zichuan, HUO Zhongming, et al. Influence of salinity stress on growth and survival of Manila clam *Ruditapes philippinarum* at various developmental stages[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2016, 31(5): 497-504.
- [19] 林笔水, 吴天明. 温度和盐度同缢蛏稚贝存活及生长的关系[J]. 水产学报, 1986, 1: 41-50.
LIN Bishui, WU Tianming. The relations of temperature and salinity to the survival and growth of the spat of *Sinonovacula constricta*[J]. Journal of Fisheries of China, 1986, 1: 41-50.
- [20] 林笔水, 吴天明. 温度和盐度对缢蛏浮游幼虫发育的影响[J]. 生态学报, 1984, 4: 385-392.
LIN Bishui, WU Tianming. The effects of temperature and salinity on the larvae of *Sinonovacula constricta* (Lamarck)[J]. Acta Ecologica Sinica, 1984, 4: 385-392.
- [21] 林笔水, 吴天明. 温度与盐度和缢蛏幼体生存、生长及发育的关系[J]. 水产学报, 1990, 3: 171-178.
LIN Bishui, WU Tianming. Temperature and salinity in relating to the survival, growth and development of the larvae and spat of *Sinonovacula constricta*[J]. Journal of Fisheries of China, 1990, 3: 171-178.
- [22] 李翠萍, 吴民耀, 王宏元. 3 种半数致死浓度计算方法之比较[J]. 动物医学进展, 2012, 33(9): 89-92.
LI Cuiping, WU Minyao, WANG Hongyuan. LC_{50} calculated by Kochi, Probit analysis and Linear regression methods[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2012, 33(9): 89-92.
- [23] 贾春生. 利用 SPSS 软件计算杀虫剂的 LC_{50} [J]. 昆虫知识, 2006, 3: 414-417.
JIA Chunsheng. Calculating the LC_{50} of insecticides with software SPSS[J]. Chinese Bulletin of Entomology, 2006, 3: 414-417.
- [24] PENG M, LIU X, NIU D, et al. Survival, growth and physiology of marine bivalve (*Sinonovacula constricta*) in long-term low-salt culture[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 2819.
- [25] 彭茂潇. 缢蛏对内陆水域重要水环境因子耐受性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020: 17.
PENG Maixiao. Study on tolerance of Chinese Razor clam (*Sinonovacula constricta*) to important water environmental factors in inland waters[D]. Shanghai: Shanghai ocean University, 2020: 17.
- [26] PALACIOS E, BONILLA A, LUNA D, et al. Survival, Na^+/K^+ -ATPase and lipid responses to salinity challenge in fed and starved white pacific shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae[J]. Aquaculture, 2004, 234(1/4): 497-511.
- [27] CHENG W, YE H S, WANG C, et al. Osmotic and ionic changes in Taiwan abalone *Haliotis diversicolor subtexta* at different salinity levels[J]. Aquaculture, 2002, 203(3): 349-357.
- [28] GARCON D P, MASUI D C, MANTELATTO F L M, et al. Hemolymph ionic regulation and adjustments in gill (Na^+ , K^+)-ATPase activity during salinity acclimation in the swimming crab *Callinectes ornatus* (Decapoda, Brachyura)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2009, 154(1): 44-55.
- [29] SHUI C, SHI Y, HUA X, et al. Serum osmolality and ions, and gill Na^+/K^+ -ATPase of spottedtail goby *Synechogobius ommaturus* (R.) in response to acute salinity changes[J]. Aquaculture and Fisheries. 2018, 3(2): 79-83.
- [30] CHEN Y, YE B, NIU D, et al. Changes in metabolism and immunity in response to acute salinity stress in Chinese razor clams from different regions[J]. Aquaculture Reports, 2021, 19: 100624.
- [31] 刘志鸿, 牟海津, 王清印. 软体动物免疫相关酶研究进展[J]. 海洋水产研究, 2003(3): 86-90.
LIU Zhihong, MOU Haijin, WANG Qingyin. Research progress of immune related enzymes in Mollusca[J]. Marine Fisheries Research, 2003(3): 86-90.
- [32] 陈竞春, 石安静. 贝类免疫生物学研究概况[J]. 水生生物学报, 1996, 1: 74-78.
CHEN Jingchun, SHI Anjing. Malacozoan immunobiology research[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1996(1): 74-78.
- [33] 周永灿, 潘金培. 贝类细胞和体液的防御机制研究进展[J]. 水产学报, 1997(4): 449-454.
ZHOU Yongcan, PAN Jinpei. Progress on researches of cellular and humoral defense mechanisms in molluscs[J]. Journal of Fisheries of China, 1997, 4: 449-454.
- [34] 吴静. 温度和盐度对华贵栉孔扇贝 (*Mimachlamys nobilis* Reeve) 存活、免疫指标及生理指标的影响[D]. 福州: 福建师范大学, 2016: 31.
WU Jing. Effects of temperature and salinity on survival, immune indexes and physiological indexes of *Mimachlamys nobilis* Reeve[D]. Fuzhou: Fujian Normal University, 2016: 31.

Effects of high salt stress on survival and enzyme activities of *Sinonovacula constricta* juvenile

CAO Wei^{1, 2}, CHI Chang-feng¹, DONG Ying-hui⁴, BI Si-qi⁵, LIU Zhi-hong^{2, 3},
SUN Xiu-jun^{2, 3}, ZHOU Li-qing^{2, 3}, WU Biao^{2, 3}

(1. Zhejiang Ocean University, National Engineering Research Center of Marine Facilities Aquaculture, Zhoushan 316022, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071, China; 3. Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao 266071, China; 4. Zhejiang Wanli University, Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resources of Zhejiang, Ningbo 315100, China; 5. Tianjin Agricultural College, Tianjin Key Laboratory of Aqua-ecology and Aquaculture College of Fisheries, Tianjin 300384, China)

Received: Jul. 25, 2021

Key words: *Sinonovacula constricta* juvenile; high salt stress; LC_{50} ; enzyme activities

Abstract: To investigate the effects of high salt stress on the survival and enzyme activities of *Sinonovacula constricta* juvenile with a shell length of ~2 cm, the individuals were randomly divided into six groups with different salinities of 20‰ (S_{20}), 25‰ (S_{25}), 30‰ (S_{30}), 35‰ (S_{35}), 40‰ (S_{40}) and 45‰ (S_{45}). The mortalities of *S. constricta* juvenile in each group were calculated, and the half lethal salinity (LC_{50}) at different stress times was analyzed by two methods. Furthermore, the activities of Na^+-K^+ -ATPase (NKA), acid phosphatase (ACP), and alkaline phosphatase (AKP) of the individuals from groups S_{20} , S_{30} , and S_{40} were analyzed, respectively. The results showed that the mortality rates of groups S_{20} , S_{25} , S_{30} , S_{35} , S_{40} , and S_{45} at 120 h were 0, $(2.17 \pm 0.85)\%$, $(9.50 \pm 0.82)\%$, $(30.67 \pm 3.70)\%$, $(73.50 \pm 7.08)\%$, and $(94.67 \pm 3.06)\%$, respectively. All the individuals of group S_{45} died at 168 h. The LC_{50} of high salinity analyzed at 72, 96, 120, 144, and 168 h were 46.03‰, 39.85‰, 35.77‰, 34.57‰ and 33.69‰, respectively, via the linear regression method, and 44.31‰, 40.74‰, 36.96‰, 35.67‰ and 34.47‰, respectively, via the probit analysis method. As the salinity increased and the treatment lasted longer, NKA, AKP, and ACP activities first increased, further decreasing and stabilizing. The three enzymes showed similar change trends with different effect times. Salinity above 30‰ might cause great damage to the body by reducing the osmotic pressure regulation and immune defense function. This study provides useful data for the future culture of *S. constricta*.

(本文编辑: 康亦兼)