

養殖九孔耐低鹽度之探討



林式修、曾福生、林金榮
水產試驗所水產養殖組

前言

近年來台灣的養殖九孔苗因無法附板著苗及大量死亡，造成嚴重損失，可能原因有細菌、病毒感染或因環境變化等所導致，因應之道除了養殖環境及經營管理模式需要再加強，提高九孔抵抗環境緊迫的能力更是迫在眉睫。又，台灣養殖九孔常因豪大雨的影響，使所處環境海水鹽度急速下降，造成大量死亡，損失慘重。本研究利用不同鹽度的海水短時間緊迫九孔及經過豪大雨淡化而活存的九孔子代，比較其對低鹽度之耐受性的差異，並抽取其鰓蛋白質，經硫銨分劃、SDS-PAGE 分析後，探討其與低鹽度之耐受性的關係。

材料

九孔稚貝：將海水繁養殖研究中心繁殖的九孔稚貝運回基隆本所，在鹽度為 35 psu 的海水中蓄養 3 wk，這批九孔平均體重為 1.14 ± 0.52 g ($2.78 - 0.33$ g)，平均殼長為 22.41 ± 3.46 mm ($37.59 - 15.95$ mm)。

經豪大雨而活存九孔的子代：自東部海洋生物研究中心選取經豪大雨淡化後仍然活存之九孔所繁殖成功之子代，運回基隆本所，在 35 psu 海水中蓄養 3 wk，這批九孔平均體重為 17.15 ± 6.75 g ($34.95 - 5.95$ g)，平均殼長為 $74.81 - 42.26$ mm ($74.81 - 42.26$ mm)。

不同鹽度短時間緊迫試驗

將九孔放入自行設計、採購、組裝、測試之抗緊迫九孔養殖循環水系統—3 個 40 L FRP 桶放在以角鋼架所組裝的 3 層架上，內置打氣石，各桶以塑膠管聯接，將已調整鹽度的海水經由浮游生物網、生物濾球過濾後，注入最底層之第 4 個 40 L FRP 桶，再經馬達抽到各桶，反覆循環之，以 5、15、25 spu 的海水短時間緊迫。

蛋白質抽取與定量

選取於 5、15、25 psu 海水緊迫 1.5 hr 之九孔數隻，以所處環境之乾淨海水浸洗數次，將其鰓組織剪下，加入 Lysis buffer 【50mM $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, pH 7.0；0.1 M NaCl；0.1 mM EDTA；0.2% Triton X-100；10 mM β -Mercaptoethanol】200 μl ，以研磨棒初步研磨成水樣狀後，再加入 500 μl PBS buffer，均勻混合之後置於 -70°C 下 24 hr，以 $10000 \times g$ 、30 min、 4°C 離心，取上清液，以 20%、80%、50% 硫銨沉澱蛋白質，將沉澱蛋白質再溶解後，以 Bradford 法定量，調整蛋白質量進行 SDS-PAGE 分析。

水質環境測定

水溫以電子式 K Type Thermocouple 探棒測定；鹽度以 ATAGO Hand-held

Refractometer 鹽度計測定；氮-氮以 phenol hypochlorite 法測定 (Solorzano, 1969)；亞硝酸-氮以 Bendschneider and Robinson (1952) 的方法測定；硝酸-氮則以紫外光篩選法測定 (APHA et al., 1998)。

實驗過程中所測得之水質環境為水溫 $19.5 - 28.5^{\circ}\text{C}$ ，pH $7.85 - 8.30$ ，總氮-氮 $0.1064 - 0.2688 \text{ ppm}$ ，亞硝酸-氮 $19.818 - 0.2417 \mu\text{g/L}$ ，硝酸-氮 $1.65 - 1.74 \text{ ppm}$ 等，均在正常的養殖範圍。

九孔稚貝對低鹽度的耐受性

九孔稚貝以 5、15、25 psu 海水，每次分別緊迫 0.5 hr、2.5 hr，其 7 天之活存率分別為 46.2%、80.0%、90.3% (圖 1)；如持續在 5 psu、15 psu 海水緊迫，只能活存 1—2 day。九孔稚貝對 5 psu 海水環境相當敏感，無法在此環境中活過 1 天，但如果只是短時間如 0.5 hr 緊迫後，馬上恢復成正常 35 psu 海水，則並不會影響其生理機能，可活存超過 13 天；但如在 5 psu 海水環境下留置時間稍長一點，如 1 hr 緊迫後，雖然立刻恢復成正常海水養殖，則其生理機能已受影響，養

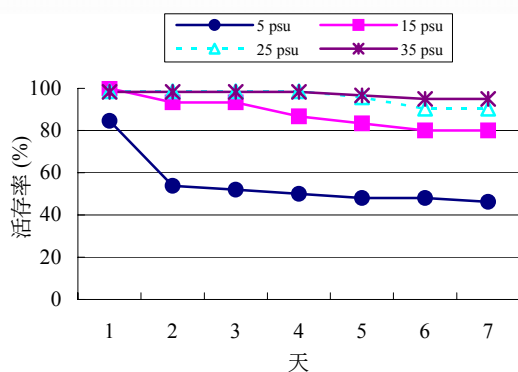


圖 1 九孔稚貝在不同鹽度海水短時間緊迫之活存率

殖 7 天後只有不到一半能活存，故爾後開放循環水養殖九孔，如遇下豪大雨等將海水淡化到鹽度 5 psu 時，在黃金半小時內趕快將海水恢復成正常的 35 psu 海水，則對九孔並不會造成傷害，否則其損失將會超過一半。

一直在鹽度 15 psu 海水緊迫之九孔，2 day 後全部死亡，只緊迫 1.5、2.5 hr 者有 7、8 成的活存率，而在 25 psu 海水中緊迫之九孔，7 天活存率超過 9 成，故對 15 psu 海水中緊迫九孔之鰓蛋白質組成影響必須加以探討。

經豪大雨後而活存之九孔子代對低鹽度的耐受性

將這些九孔分別放入 5 psu、15 psu 海水緊迫 1.5 hr 後，馬上恢復成正常 35 psu 海水，其 7 天活存率分為 83.1%、78.3%，而一直在 25 psu 海水中持續緊迫，其 7 天活存率分為 90.2%，對照組則為 100.0% (圖 2)；其活存率比未經天擇的九孔高得很多，這種耐鹽度特性是否經由親代遺傳下來，值得進一步探究。

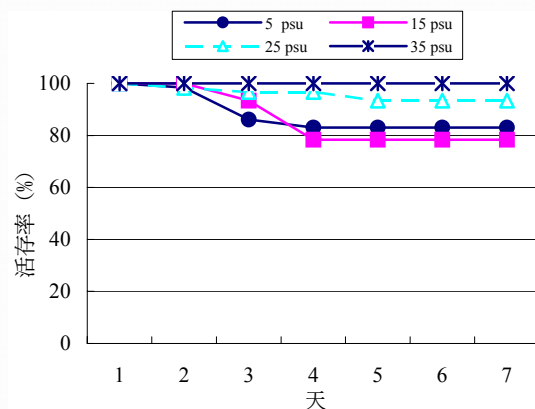


圖 2 經豪大雨活存之九孔子代在不同鹽度海水緊迫 1.5 hr 之活存率

鰓蛋白質抽取與差異

以三種不同濃度硫鉍 (20、50 及 80%) 萃取九孔鰓蛋白質，20%的硫鉍溶液無法萃取，50%的硫鉍溶液雖可以萃取但沒有量的差異，80%者只能萃取經 5 psu 海水緊迫的九孔鰓組織抽出物的蛋白質，其萃取量隨著鹽度的下降顯著的提高 (圖 3)。

九孔在 15 psu 海水下緊迫 1.5、2、2.5、3、3.15 hr 後，其鰓蛋白質的抽取，在約 35 kDa 條帶的變化量有明顯的先降後升的時間差異 (圖 4)，這或許可作為篩選耐低鹽度九孔的標誌；又再以 50%及 80%的硫鉍萃取鰓組織抽出物，50%的硫鉍溶液萃取蛋白質量確實高於 80%者。

在低鹽環境下，九孔鰓組織中確實會產生對應蛋白質，而經豪大雨活存九孔的子代對低鹽度之耐受性較未經過天擇的九孔為高，九孔對低鹽度之耐受性似乎具遺傳性，其遺傳基因值得加以探究。

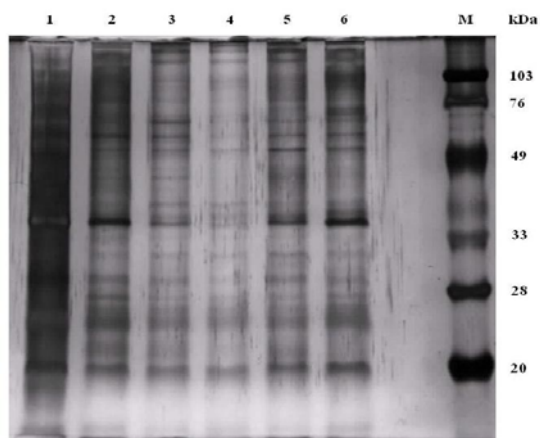


圖 3 九孔在 15 psu 海水中，不同緊迫時間下之鰓組織蛋白質的抽出量 (lane 1、2、3、4 分別為 3.15、3、2、1.5 hr)

結語

台灣九孔養殖環境常因豪大雨的影響，使海水鹽度急速下降，因而造成大量死亡。實驗利用不同低鹽度、短時間緊迫九孔稚貝，得知其活存率隨著鹽度降低而降低，如持續在 5 psu 及 15 psu 海水緊迫，只能活存 1—2 天。九孔經不同鹽度、時間緊迫後，抽取其鰓蛋白質經硫鉍分劃、SDS-PAGE 分析，以 80%的硫鉍萃取九孔鰓蛋白質，其萃取量隨著鹽度的下降而顯著的提高。但這些沉澱萃取的蛋白質是正在降解，還是因應低鹽度逆境所生成，則有待進一步的確認。九孔對低鹽度之耐受性是否具遺傳性，值得探究解明九孔抗緊迫能力的形成機制；對鰓蛋白質特定條帶進一步分析，篩選出對低鹽度環境具耐性之九孔，提高九孔養殖之活存率，減少因鹽度降低對九孔養殖業者造成的損失。

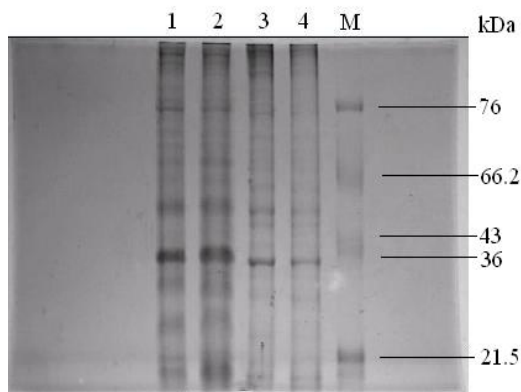


圖 4 以 10% SDS-page 分析九孔在低鹽海水 (15 psu) 環境下和正常海水鹽度 (35 psu) 下 3 小時，其鰓組織蛋白質的差異。Lane 1、2：15 psu 海水下分別以 50、80%硫鉍沉澱；lane 3、4：35 psu 海水下分別以 50、80%硫鉍沉澱