

逆境环境因素对三疣梭子蟹幼蟹致死效应分析

高 焕¹, 张本厚¹, 陈百尧², 于 飞², 阎斌伦¹, 陈建华¹

(1. 淮海工学院 江苏省海洋生物技术重点建设实验室, 江苏 连云港 222005; 2. 连云港市海洋与水产科学研究所, 江苏 连云港 222042)

摘要: 利用正交试验设计, 研究了温度、盐度和酸碱度 3 种环境因素逆境下对三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)幼蟹的致死效应, 以阐明三疣梭子蟹幼蟹对不同逆境环境的抵抗力大小。3 种逆境环境因素的水平分别是: 温度为 10, 15, 30, 35℃; 盐度为 10, 15, 35, 40; 酸碱度为 6.0, 6.5, 9.0, 9.5。结果表明, 盐度变化对梭子蟹幼蟹的影响最大, 其次为酸碱度, 再次为温度。对于温度而言, 低温下幼蟹的存活时间较长; 对于盐度而言, 高盐度逆境比低盐度逆境下的存活时间长; 对于 pH 值而言, 碱性环境下的存活时间比酸性环境下的存活时间长。

关键词: 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*); 逆境环境; 半致死时间

中图分类号: Q178

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2010)02-0057-05

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*) 是一种大型的经济蟹类, 主要分布于中国渤海、黄海、东海, 以及朝鲜、韩国、日本和菲律宾等海域, 在中国山东、江苏、浙江等沿海地区的养殖规模很大。目前三疣梭子蟹的育苗和养殖技术已经比较成熟^[1, 2], 这主要得益于对三疣梭子蟹育苗和养殖适宜环境因素的研究^[3-5], 但对于适宜生存环境之外的环境变化对三疣梭子蟹生存的影响未见报道。阐释物种在逆性环境下的反应能力, 对于了解物种在自然界中的生存能力大小具有重要的意义。同时, 同一物种内个体间应变能力的差异也是体现不同个体种质差异的一个重要表现, 在选种和育种中也具有重要的参考价值, 如据此可以根据抵抗逆性环境能力的差异建立评定苗种质量的快速检测技术, 亦或在环境临界点探讨物种的育苗技术等。作者旨在探讨不同逆境因素对三疣梭子蟹影响的差异, 以期指导三疣梭子蟹的苗种生产和养殖, 也为研究三疣梭子蟹应变环境变化的内在机制提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

本实验在江苏省连云港市长丰育苗场进行, 采用同一家系的 期幼蟹进行试验研究。实验所用容器为 500 mL 的玻璃烧杯。实验用水为二级沙滤海水,

盐度 30 ± 0.3 , pH 8.0 ± 0.2 , 温度 21 ± 0.2 。

采用卤虫(*Artemiasalina*)作为饵料投喂幼蟹。

1.2 研究方法

1.2.1 环境因子的条件控制

幼蟹分别安排在 500 mL 烧杯中进行实验。采用手持式折射仪测定海水的盐度, 便携式 pHB-5 型 pH 计测定 pH 值, 温度计测定水体温度。利用海水粗提盐调节盐度大小, 用 1 mol/L 盐酸和氢氧化钠溶液调节 pH 值。把同一温度梯度的实验组安排在同一塑料箱中进行, 塑料箱中加入一定体积的淡水, 通过加入冰块和热水(80~100)调节塑料箱中水体的温度, 以水浴方式调节实验组烧杯中的水温, 温差控制在 ± 0.5 范围内。

1.2.2 逆性环境因子的设定及正交试验设计

三疣梭子蟹正常育苗时的温度为 20~27 , 盐度为 18~27, pH 值为 7.5~8.4^[6]。针对以上 3 个因素, 本实验中各设置 4 个水平(表 1)。

收稿日期: 2008-10-12; 修回日期: 2008-12-23

基金项目: 江苏省海洋资源开发研究院科技开放基金项目(JSIMR09A03); 江苏省水产三项工程资助项目(k2008-6); 淮海工学院引进人才科研启动基金资助项目(KQ07048)

作者简介: 高焕(1976-), 男, 江苏东海人, 淮海工学院讲师, 博士, 主要从事水生生物种质资源与遗传育种研究, 电话: 13951258651, 0518-85895252, E-mail: huanmr@163.com

表 1 因素及其水平

Tab. 1 Factors and factor levels

水平	因素		
	温度()	盐度	pH
1	10	10	6.0
2	15	15	6.5
3	30	35	9.0
4	35	40	9.5

以上实验安排依照正交实验设计表 L16(45) 进行安排, 每个实验组共设置 16 个实验, 各烧杯中放置 10 个幼蟹。另外设置一组重复和正常育苗水体条件下的对照组。

1.2.3 数据处理

观察并记录实验组、重复组、对照组蟹苗活动状况。每隔一段时间(开始 0.5 h 每隔 2 min, 0.5~1 h 每隔 10 min, 1~11 h 每隔 1 h, 11 h 以后每隔 2 h)统计记录各组幼蟹的死亡时间。

以半致死时间和平均死亡时间两个数值来表示各组幼蟹耐受程度的最终结果。半致死时间 LT_{50} (Median lethal time)的公式根据半致死浓度的公式^[7]修改而来, 具体如下:

表 2 幼蟹的半致死时间

Tab. 2 Median lethal time of larva crab

实验号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
半致死时间	实验组	0.5	0.23	16	8.5	0.1	0.17	15	16	0.22	0.4	2	6.67	0.12	0.08	4.67	4
	重复组	0.23	0.36	16.5	13	0.1	0.24	15	12	0.23	0.45	2	5	0.11	0.1	4	3.5
	平均	0.365	0.295	16.25	10.75	0.1	0.205	15	14	0.225	0.425	2	5.835	0.115	0.09	4.335	3.75
死亡情况	实验组	0.59	0.51	15.4	13.8	0.19	9.0	18.1	17.5	0.22	0.56	7.4	7.0	0.14	0.11	4.3	4.1
	重复组	0.55	0.67	17.4	14.0	0.16	14.0	16.7	11.7	0.22	0.52	6.4	5.0	0.13	0.13	4.2	3.9
	平均	0.57	0.59	16.4	13.9	0.175	11.5	17.4	14.6	0.22	0.54	6.9	6.0	0.135	0.12	4.25	4.0

从表 2 可以看出, 幼蟹的半致死时间为 0.09~15 h, 平均致死时间为 0.12~17.4 h。二者分布的规律基本相似, 为了更明确地判断两个统计量间是否存在差别, 把两个变量数值看作一对成组资料进行两个变量值的比较。利用 SPSS 软件进行分析, 两尾检验表明, $P=0.067>0.05$, 两者间不存在显著性差异。因此在下文进一步的数据处理分析中, 只采用半致死时间作为正交试验结果的统计标准。

$$LT_{50} = C_1 + \frac{P_1 - 50\%}{P_1 - P_2} \times (C_1 - C_2)$$

式中, C_1 和 C_2 分别为存活率接近 50% 时的低时间和高时间, P_1 和 P_2 分别为相应的存活率。

平均死亡时间(T_d)的计算公式:

$$T_d = \frac{\sum(n_i \times t)}{10}$$

式中, T_d 为平均死亡时间, n_i 为第 i 时间死亡个数, t 为对应个体的死亡时间。

利用正交设计助手 II V3.1 专业版软件及 SPSS14.0(SPSS Inc., Chicago, IL)进行数据分析。

2 结果

2.1 幼蟹死亡和存活情况

经过 28 h 观察, 实验组和重复组内的幼蟹全部死亡, 其中实验组和重复组内最短 1 min 内有幼蟹死亡, 最长存活时间达 28 h。对照组三疣梭子蟹幼蟹没有任何个体死亡。根据死亡时间和死亡的个体数, 分别计算半致死时间和平均致死时间, 列于表 2。

2.2 环境因素突变对幼蟹存活的影响差异

根据正交试验设计表, 输入各实验组的实验结果, 见表 3。利用正交试验分析软件“正交设计助手”(V3.1 专业版, 颜承)对该实验结果进行分析, 以阐明温度、盐度和酸碱度变化对幼蟹的影响, 不同因素引起幼蟹死亡的极差值见表 4。

极差值越大, 表明相应因素变化对实验结果的

表 3 正交直观分析

Tab. 3 The orthogonal intuitive analysis on average value of LT_{50}

因素	温度	盐度	pH	LT_{50}
实验 1	1	1	1	0.365
实验 2	1	2	2	0.295
实验 3	1	3	3	16.25
实验 4	1	4	4	10.75
实验 5	2	1	2	0.1
实验 6	2	2	1	0.205
实验 7	2	3	4	15
实验 8	2	4	3	14
实验 9	3	1	3	0.225
实验 10	3	2	4	0.425
实验 11	3	3	1	2
实验 12	3	4	2	5.835
实验 13	4	1	4	0.115
实验 14	4	2	3	0.09
实验 15	4	3	2	4.335
实验 16	4	4	1	3.75
均值 1	6.915	0.201	1.580	
均值 2	7.326	0.254	2.641	
均值 3	2.121	9.396	7.641	
均值 4	2.072	8.584	6.572	
极差	5.254	9.195	6.061	

表 4 平均 LT_{50} 值正交方差分析

Tab. 4 The orthogonal analysis of variance on average value of LT_{50}

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	差异显著性
温度	101.295	3	16.112	9.280	显著
盐度	308.451	3	49.062	9.280	显著
pH	104.387	3	16.604	9.280	显著
误差	6.29	3			

表 5 盐度与温度的交互作用对三疣梭子蟹幼蟹存活的影响

Tab. 5 Effect of the mutual action between temperature and salinity on the larva crab livability

盐度	温度()			
	10	15	30	35
10	0.365	0.100	0.225	0.115
15	0.295	0.205	0.425	0.090
35	16.250	15.000	2.0	4.335
40	10.750	14.000	5.835	3.750

影响越大, 反之亦然。从表 3 可以看出, 极差值的大小依次为 9.195(盐度)>6.061(pH)>5.254(温度)。因此盐度变化是影响幼蟹死亡的最重要原因。从表 3 还可以看出, 对于温度而言, 低温下幼蟹的存活时间较长, 如 10 (均值 1)和 15 (均值 2)下的存活时间分别为 6.915 h 和 7.326 h, 而高温 30 (均值 3)和 35 (均值 4)下的存活时间分别为 2.121 h 和 2.072 h; 对于盐度而言, 高盐度逆境比低盐度逆境下的存活时间长, 对于 pH 值而言, 碱性环境下的存活时间比酸性环境下的存活时间长。方差分析(表 4)进一步表明, 温度、盐度和 pH 值各因素各个水平间的差异均达到了显著性水平。

2.3 环境因素间的交互作用对幼蟹存活的影响

温度与盐度的交互作用对三疣梭子蟹幼蟹的影响见表 5。由表 5 可以看出, 在高盐度(35 和 40)和低温(10 和 15)下, 幼蟹的存活时间较长, 平均为 $(16.250+15.000+10.750+14.000)/4=14$ h; 其次为高盐度(35 和 40)和高温度 30 和 35)下存活时间也较长(平均为 3.98 h), 而在低盐度环境(10 和 15)和低温(10 和 15)或者低盐度(10 和 15)和高温(30 和 35)下存活时间较短, 分别平均为 0.241 h 和 0.214 h。同一温度下, 高盐度胁迫比低盐度胁迫有利于幼蟹存活; 同一盐度下, 低温胁迫比高温胁迫有利于幼蟹存活。

温度与酸碱度(pH)间的交互作用对三疣梭子蟹幼蟹的影响见表 6。由表 6 可以看出, 在碱性环境(pH9.0, 9.5)和低温(10 和 15)下, 幼蟹的存活时间较长, 平均为 $(16.250+14.000+10.750+15.000)/4=14$ h; 其次为酸性环境(pH6.0, 6.5)和高温度(30 和 35)下存活时间也较长(平均为 3.98 h), 而在酸性环境(pH6.0, 6.5)和低温(10 和 15)或者碱性环境(pH9.0, 9.5)和高温(30 和 35)下存活时间较短, 分别平均为 0.241 h 和 0.214 h。低温胁迫条件下, 幼蟹在碱性胁迫下比酸性胁迫的存活时间长, 而高温

表 6 温度与 pH 的交互作用对三疣梭子蟹幼蟹存活的影响

Tab. 6 Effect of the mutual action between temperature and pH on the larva crab livability

pH	温度()			
	10	15	30	35
6.0	0.365	0.205	2.000	3.750
6.5	0.295	0.100	5.835	4.335
9.0	16.250	14.000	0.225	0.090
9.5	10.750	15.000	0.425	0.115

胁迫下, 幼蟹在酸性胁迫下比碱性胁迫的存活时间长; 酸性胁迫下, 幼蟹在高温胁迫下比在低温胁迫下的存活时间长, 而碱性胁迫下, 幼蟹却在低温胁迫下比在高温胁迫下的存活时间长。

盐度与酸碱度(pH)间的交互作用对三疣梭子蟹幼蟹的影响见表 7。由表 7 可以看出, 在碱性环境(pH9.0, 9.5)和高盐度(35 和 40)下, 幼蟹的存活时间较长, 平均为(16.250+14.000+10.750+15.000)/4=14 h; 其次为酸性环境(pH6.0, 6.5)和高盐度(35 和 40)下存活时间也较长(平均为 3.98 h), 而在酸性环境(pH6.0, 6.5)和低盐度(10 和 15)或者碱性环境(pH9.0, 9.5)和高盐度(35 和 40)下存活时间较短, 分别平均为 0.241 h 和 0.214 h。在低盐度胁迫下, 幼蟹在酸性胁迫下比在碱性胁迫下的存活时间长, 而在高盐度胁迫下, 幼蟹在碱性胁迫下比在酸性胁迫下的存活时间长; 在同一个酸碱度下, 三疣梭子蟹幼蟹在高盐胁迫下比在低盐胁迫下的存活时间长。

表 7 盐度与 pH 的交互作用对三疣梭子蟹幼蟹存活的影响

Tab. 7 Effect of the mutual action between salinity and pH on the larva crab livability

pH	盐度			
	10	15	35	40
6.0	0.365	0.205	2.000	3.750
6.5	0.100	0.295	4.335	5.835
9.0	0.225	0.090	16.250	14.000
9.5	0.115	0.425	15.000	10.750

3 讨论

3.1 实验设计对实验结果的影响

为了保证实验结果的可靠性, 本研究中采用了同一家系的子代进行比较研究, 这从一定程度上可

以保证用于实验研究的幼蟹的遗传背景相近, 因而减少了遗传因素差异对于实验结果的影响, 同时从重复组的结果看, 其与实验组的数据相近, 这也说明实验结果具有较好的重复性。

正交试验设计的优点在于可以用较少的实验安排考察较多的实验因素及其水平对实验结果的影响^[8], 其在食品工业和田间实验中应用较多, 水产生物中多用来考察不同因素及其交互作用对水生生物的生长和存活的影响^[9]。在本研究中, 首次研究了 3 个因素, 盐度、温度和 pH 值对三疣梭子蟹幼蟹的存活影响, 引进了半致死时间和平均致死时间两个统计量来对实验结果进行衡量, 数据分析的结果比较说明, 这两个数值都可以作为衡量正交试验结果的值, 这为展开更多的因素和水平在水产生物中的应用提供了新的思路。

3.2 逆性环境对梭子蟹幼蟹的影响

三疣梭子蟹对于温度的适应性较广, 在 5~35 范围内均能正常生活, 而 0 和 40 为其存活的极限温度^[5]。但本研究表明, 当温度剧烈变化时, 三疣梭子蟹幼蟹在低温逆境下比高温逆境的存活时间较长。这也说明了为什么三疣梭子蟹在偏冷区域分布较广, 而在热带区域分布较少, 尤其是在地球炎热的赤道附近。

三疣梭子蟹为广盐性种类, 其盐度的适应性范围为 16~35^[10]。本研究中显示盐度逆境造成三疣梭子蟹幼蟹死亡的极值最大, 说明盐度是影响幼蟹存活的最主要因素, 这也说明幼蟹对盐度变化较为敏感。其原因可能是幼蟹的渗透压调节功能还不健全造成的, 当然也可能是本研究中盐度差过大引起的应急死亡现象, 因此具体原因还有待进一步的研究。

目前, 酸碱度对水生生物毒性作用的研究相对较少, 尤其是在甲壳类生物中^[11]。本实验结果显示酸碱度对三疣梭子蟹幼蟹的影响也是非常显著的, 甚至略高于温度的影响, 而且在碱性逆境下幼蟹的存活时间高于酸性逆境下的存活率。事实上, 三疣梭子蟹育苗水环境也是偏碱性的(pH7.8~8.6)^[10]。这也说明三疣梭子蟹幼蟹对于碱性环境的适应性较高。

温度、盐度和酸碱度三者间的互作作用对幼蟹存活情况也是存在差异的, 如同一温度下, 高盐度胁迫比低盐度胁迫有利于幼蟹存活; 同一盐度下, 低温胁迫比高温胁迫有利于幼蟹存活。这可能与不同因素间存在的关联性有关, 如在碱性条件下, 水

体中的 HO^- 较高, 必然与水体中的二价阳离子结合形成沉淀而使二价阳离子减少, 这加剧了一价阳离子和二价阳离子比例的失衡^[11], 因此引起生物机体正常代谢对这些离子的需求, 引起功能紊乱, 加速幼蟹的死亡。这也显示在三疣梭子蟹育苗和养殖中, 有必要高度重视水体的酸碱度变化。

参考文献:

- [1] 肖国华, 赵春龙, 崔兆进. 三疣梭子蟹人工育苗及养成病害发生的主要原因及防治方法[J]. 齐鲁渔业, 2006, 23(3): 36-37.
- [2] 杨树娥, 张忠悦, 王淑英. 三疣梭子蟹健康养殖技术研究[J]. 河北渔业, 2006, 12: 21-22, 58.
- [3] 孔维军, 李昕, 许波, 等. 三疣梭子蟹人工育苗试验[J]. 水产科学, 1999, 18(4): 35-38.
- [4] 陈伟, 张晓明, 王力勇. 养殖三疣梭子蟹室内越冬试验[J]. 齐鲁渔业, 1998, 15(4): 18-19.
- [5] 廖永岩, 肖展鹏, 袁耀阳. 三疣梭子蟹幼体和幼蟹的温度适应性[J]. 水生生物学报, 2008, 32(4): 534-543.
- [6] 陈金先. 三疣梭子蟹幼苗培育技术[J]. 中国水产, 2008, 4: 50-51.
- [7] 周永欣, 章宗涉. 水生生物毒性试验方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1989. 34-39.
- [8] 王钦德, 杨坚. 食品试验设计与统计分析[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2005.
- [9] 赵晓红, 金送笛. 低温、降盐度及 pH 对中华绒螯蟹幼体变态的影响[J]. 大连水产学院学报, 2001, 16(4): 249-256.
- [10] 刘洪军. 无公害海水蟹标准化生产[M]. 北京: 中国农业出版社, 2006.
- [11] 王贵春. 盐度和碱度对河蟹幼蟹毒性作用的研究[J]. 苏盐科技, 2007, 1: 24-26.

Analysis on lethal effect of adversity on the *Portunus trituberculatus*

GAO Huan¹, ZHANG Ben-hou¹, CHEN Bai-yao², YU Fei², YAN Bin-lun¹, CHEN Jian-hua¹

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China; 2. Marine Fisheries Research Institute of Lianyungang, Lianyungang 222042, China)

Received: Oct. 12, 2008

Key words: *Portunus trituberculatus*; adversity; median lethal time

Abstract: Using an orthogonal experiment plan, three kinds of adversity, temperature, salinity and pH, were used to test the resistance of the larva of *Portunus trituberculatus*. The factor levels of three kinds of adversity, are 10, 15, 30, and 35°C for temperature, 10, 15, 35, and 40 for salinity, and 6.0, 6.5, 9.0, and 9.5 for pH, respectively. The results discovered that the salinity was the most important factor affecting the livability of crab, and sub-important factor was pH, and the third-important factor was temperature. The living time of crabs in low temperature was longer than that in high temperature, however, it is more longer in high salinity than in low salinity. For pH, the alkaline environment is more propitious to the livability of crab than acid environment.

(本文编辑: 梁德海)