

塩度馴化中吳郭魚生理變化

鄭恒仲·丁雲源

Study on the physiological change of *Tilapia* under various salinities

Heng-Yeng Chang and Yu-Yung Teng

Oreochromis niloticus (♀) and *Oreochromis aureus* (♂) hybrids produce a no sex male, when they are from fresh water trans to 15‰ salinity of sea water, the total and Na-K ATPase activity and Na⁺ ion increased with relation to post-transfer time. After 12 hrs that Value begin to decreased. After 72 hrs it recover the same as the freshwater condition. The water content of body lose also relation to post-transfer time, the water content of body is decreased at first. After 12 hrs that begin to increase, 72 hrs it recovered. When the fish from freshwater trans to 32‰ salinity of sea water, the total and Na-K ATPase activity after 4 hrs at high point then decreased very fast, Na⁺ is increased, the water content of body lose its volume over 10%. After 12 hrs the fish begin to dying.

前 言

鰓在硬骨魚類滲透壓調節之功能，主要是調節單價離子的平衡，在淡水硬骨魚類，主要功能是由鰓表層之塩類細胞(chloride cells)之細胞膜上Na-k actuated ATPase的作用，以獲取體內所需要的離子。對於海水硬骨魚類而言，鰓具有排除體內過量離子的功能⁽¹⁾。ATPase能促使ATP產生水解，產生能量，將細胞外的鉀離子吸入和鈉子變換，使鈉離子釋出，藉以調節離子濃度，使達到平衡狀態⁽²⁾，廣塩性魚類的鰓，能適時地轉變其性質以適應各種不同的環境，當其在淡水時Na-k activated ATPase的活性很低，但在海水時則會加強其活性⁽³⁾。因此以Na-k Activated ATPase的活性來做為魚類對環境滲透壓調節適應能力的指標⁽⁴⁾。淡水魚類無法忍受海水中各種環境的改變，因而發生脫水而死的現象如Gold fish (*Carassius auratus*)進入塩度15‰的水域後，即產生死亡，並有大量水分散失因而需要大量喝水以補充水分及鈉離子明顯增加的現象發生⁽⁵⁾。廣塩性魚類則可忍受較大的塩度變化，在其可忍受的塩度範圍內最初會發生代謝速率增加而後體內的生理機利會作用調節以產生穩定的狀態，甚者恢復至原來未受塩度刺激前的水準。

本實驗以*O. niloticus*(♀)和*O. aureus*(♂)雜交產出的第一子代為材料，將魚所處的環境塩度突然變化，利用其體內離子的變化及ATPase變化來觀察當吳郭魚在海水馴化時其生理變化，用以做為吳郭魚馴化至海水養殖之依據。

材料與方法

一實驗用魚：利用本分所水泥池(3×1.5×1)使niloticus(♀)和aureus(♂)雜交產生的第

一子代，再將幼魚放在水泥池（3×1.5×1）中培養至魚體長平均5cm體重平均2.0g時，再進行各項實驗採樣。

二採樣處理及方式：第一組：將魚自淡水中直接移入鹽度32‰水域中，再於0hrs, ½ hrs, 1hrs, 2hrs, 4hrs, 8hrs, 12hrs時取樣，每次採2尾魚當樣品。

第二組：將魚自淡水中直接移入鹽度15‰水域中，再於0hrs, ½ hrs, 1hrs, 2hrs, 4hrs, 8hrs, 12hrs, 24hrs, 48hrs, 72hrs時採樣，每次採2尾魚當樣品。

三魚鰓部腺核苷三磷酸酶（Adenosine triphosphatase ATPase）活性測定：本實驗以測定ToTal activated ATPase及Na-K activated ATPase兩項活性為主，測定方法參照Karnaky et al（1976）的報告⁽⁵⁾。

(一)試劑調配如表2：

表1 魚鰓ATPase活性測定流程

Table 1 The flow chart of ATPase activity assay of fish gill

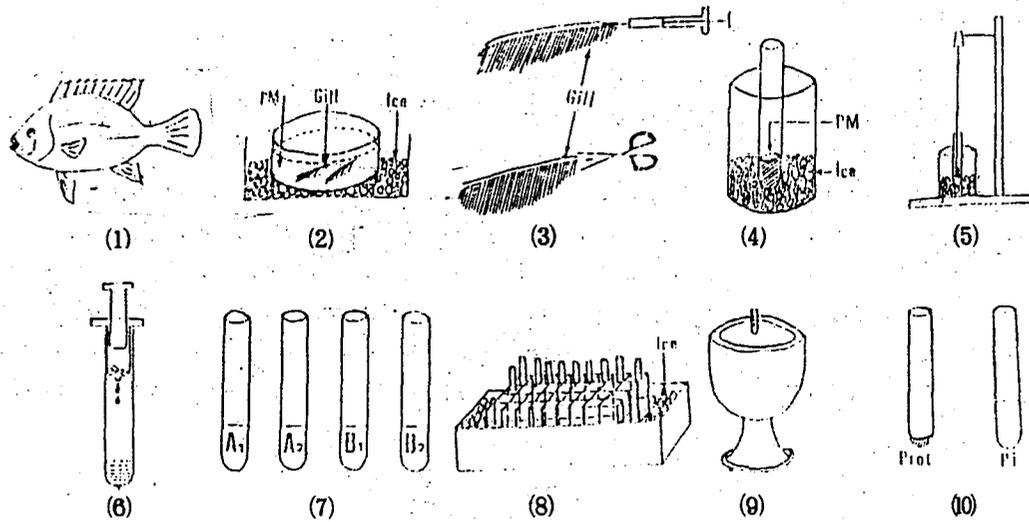


表2 ATPase活性測定藥品配方

Table 2 The medium of ATPase activity reagent

	Pre-incubation	medium
Tris-buffer	50	mM
Sucrose	250	mM
EDTA	5	mM
Sodium azide	2.5	mM
pH=7.6 (adjusted with HCL)		
	Incubation medium	
	medium A	medium B
NaCl	100 mM	100 mM
KCl	20 mM	20 mM
Mgcl · 6H ₂ O	5 mM	5 mM
Tris-buffer	50 mM	50 mM
Ouabain	0 mM	1 mM
pH=7.6 (adjusted with HCL)		

- (1)取下鰓片(4片)
- (2)浸入冷的PM Solution中並洗滌
- (3)使用針筒將鰓絲中血液清除後使用剪刀去除鰓弓,保留鰓絲
- (4)將鰓絲放入試管中加入2ml PM solution.
- (5)使用冷水浴所磨鰓絲
- (6)將研磨液倒入四至六層砂布中過濾
- (7)試管中加IM(A) 0.8ml於A₁, A₂中, IM(B) 0.8ml於B₁, B₂中。加0.2ml的研磨液到每一個培養試管中,經5分鐘的培養,加0.2ml ATP solution到試管中使發生作用,經15分鐘的培養
- (8)利用加入0.7ml的17% TCA使反應中止,並將試管放在冷水域中10分鐘。
- (9)利用離心機在3,000 rpm下10分鐘
- (10)上層澄清液做Pi分析,下層沈澱物做Protein定量

(二)ATPase activity 測定程序和方法

- 1.取樣方法:如表1。
- 2.蛋白質量測定:根據Lowery et al (1951)⁽⁷⁾的方法。
- 3.磷測定:根據Bartlett (1958)⁽⁸⁾的方法。

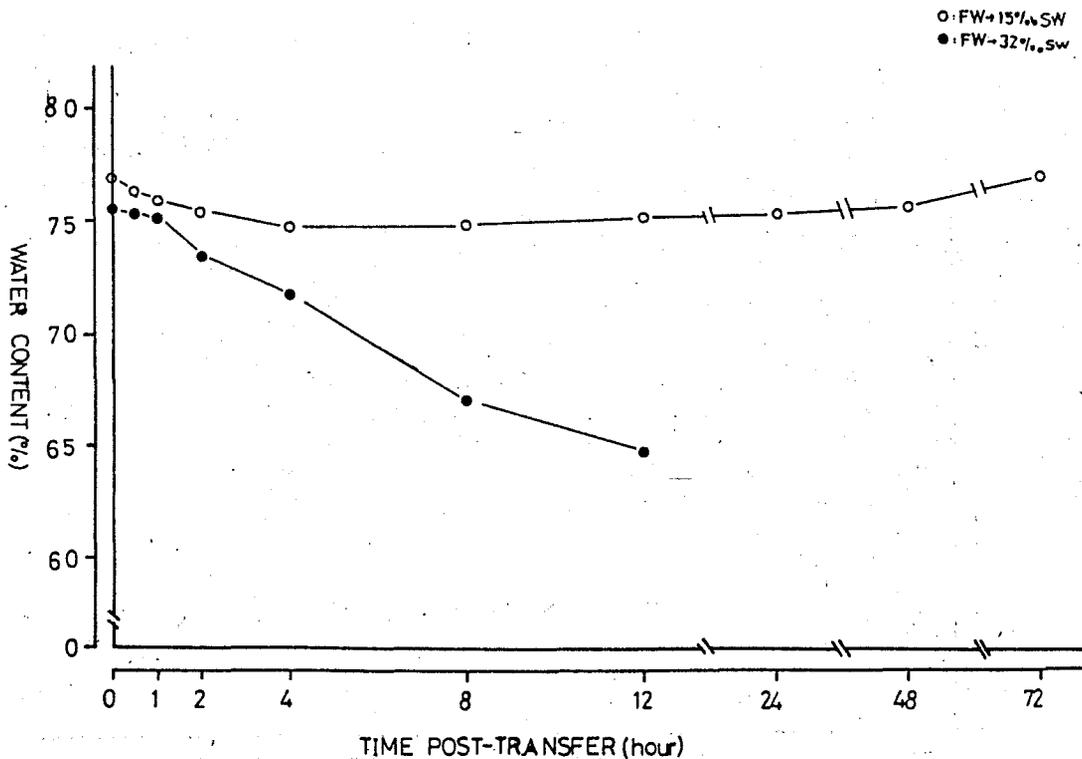


圖1 從淡水到海水肌肉含水率之變化

Fig.1 Water content change from fresh water to sea water

(三)計算

$$\text{Total activated ATPase activity} = \text{Pi (A)} / \text{Protein (A)} / \text{TIME}$$

$$\text{Na-K activated ATPase activity} = \text{Pi (A)} / \text{Protein (A)} / \text{TIME} - \text{Pi (B)} / \text{Protein (B)} / \text{TIME}$$

四肌肉樣品處理及離子濃度測定

離子測定根據 McBroom et al (1971)⁽⁹⁾ 的方法。

自背部切下 1 平方公分之魚精肉 (不包含皮及骨) 先稱重 (濕重) 再放入烤箱 (Oven) 中調至 110°C 經 48hrs 取出, 放在乾燥箱中冷卻再稱重 (乾重), 再以濕重減乾重除濕重, 求得肌肉含水量百分比。

乾燥後之肌肉再放入灰化爐中在 500°C 經 36hrs 灰化, 取出灰分。灰分以 1N HCl 溶解, 再稀釋至所需要濃度, 以原子吸收分光光度計 (Atomic Absorption Spectrophotometer. A. A) 測定。本實驗測定的項目為鈉、鈣、鎂等三種離子。

結 果

一實驗魚自淡水轉移至鹽度 32 ‰ 的海水域中。

(一) 腺嘌呤核苷三磷酸酶 (ATPase) 活性: 如圖 1 所示, 當魚由淡水移入鹽度 32 ‰ 的海水中, 初入海水中其 Total ATPase activity 會上升隨即下降 (1 hrs), 後再度上升, 在 4 hrs 時達到最高, 5.28 umpi/mg protein/15 min, 而後急速下降, 8 hrs 時即降至 2.62 umpi/mg protein/15 min, 12 hrs 時為 2.17 umpi/mg protein/15 min 比初入海水中的 2.46 umpi/mg protein/15 min 還低。

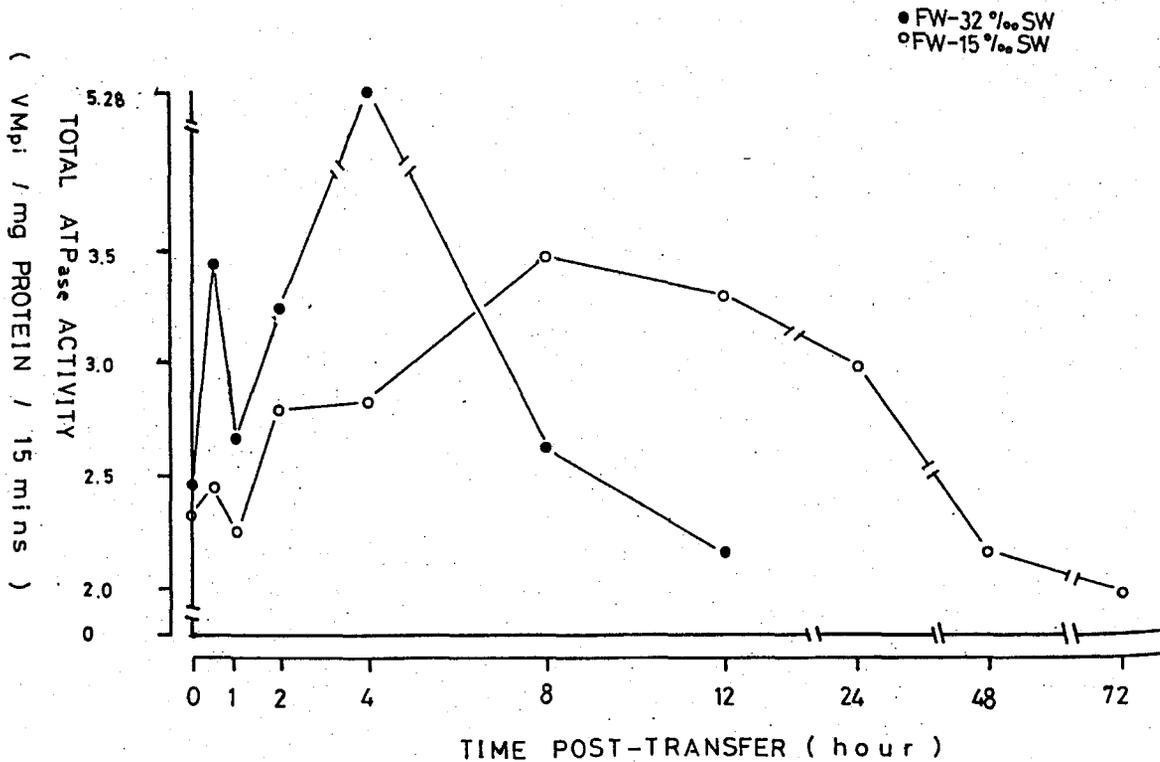


圖 2 從淡水到海水 Total ATPase 活性變化

Fig.2 Total ATPase activity change from fresh water to sec water.

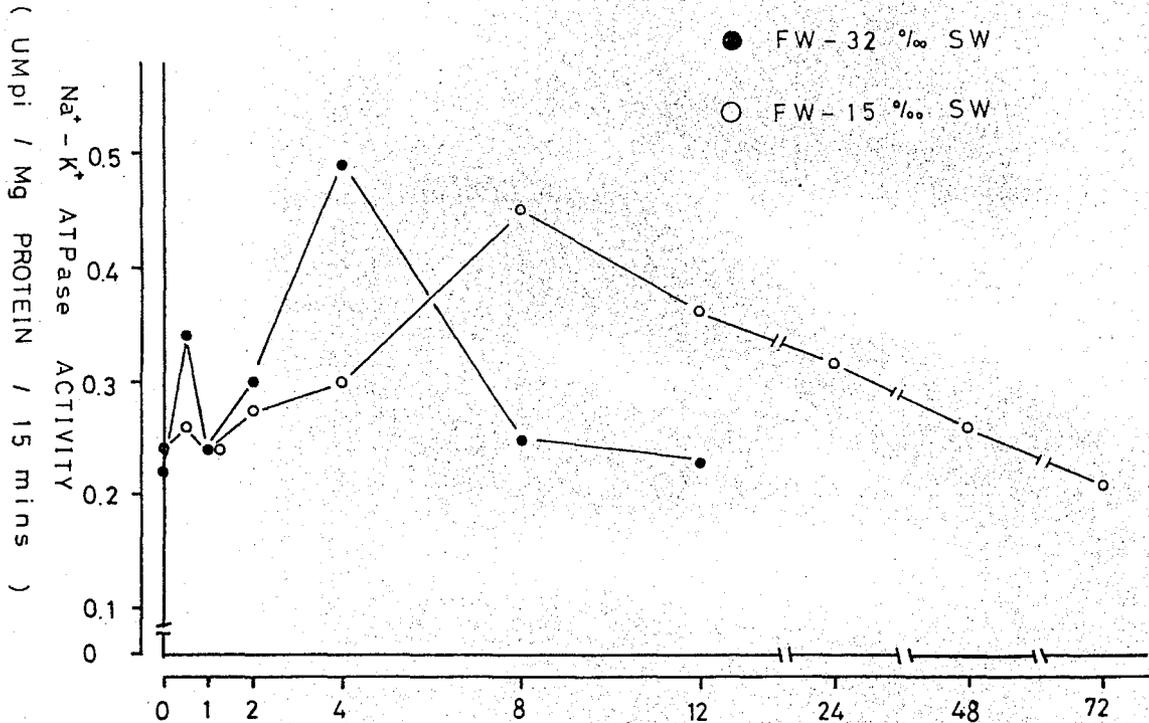


圖3 從淡水到海水 Na^+-K^+ ATPase 活性變化
Fig.3 The Na^+-K^+ ATPase Change from fresh water to sea water

$\text{Na}-\text{K}$ ATPase 的變化如圖2所示，當點自淡水中移入鹽度32‰海水中，其變化和Total ATPase 變化相似，以4hrs的0.31 umpi/mg protein/15 min為最高。其數值約為Total ATPase 的10.6~8.9%。

(二)水分及肌肉離子測定

魚自淡水移入鹽度32‰的海水中其水分變化如圖3所示，魚自淡水移入海水後，水分即不斷的流失，在要入水中時魚的肌肉含水量為75.52%，進入鹽度32‰的海水後，肌肉含水量即不斷的下降至12hrs時其肌肉含水量僅存64.66%，散失率達10%。

肌肉中的二價離子在自淡水移入鹽度32‰的海水後其變化如圖4所示， Ca^{2+} 及 Mg^{2+} 在魚自淡水轉入海水後，並不作明顯的上升或下降， Ca^{2+} 在32.39 ueq/mg至26.00 ueq/mg中跳動， Mg^{2+} 則在55.49 ueq/mg至48.16 ueq/mg中變動。 Mg^{2+} 的量約為 Ca^{2+} 的2倍。

肌肉中的一價離子變化如圖5所示。魚自淡水進入鹽度32‰的海水後， Na^+ 會隨進入海水的時間增加而增加，在淡水時為370.48 ueq/mg，進入海水後12hrs達482.97 ueq/mg。

二、實驗魚自淡水移入鹽度15‰的海水域中：

(一)腺嘌呤核苷三磷酸酶(ATPase)活性：如圖1所示魚自淡水移入鹽度15‰的海水中，其Total ATPase activity會先上升後下降(1hrs)而後再上升，在12hrs時Total ATPase activity達最高3.46 umpi/mg protein/15 min，而後即下降，在48hrs時與Total ATPase activity和在淡水中相同，在72hrs Total ATPase activity會降的比在淡水中更低。

$\text{Na}-\text{K}$ ATPase activity變化如圖2所示：其變化和Total ATPase activity相似，在12hrs時最高0.46 umpi/mg protein/15 min，而後下降，72hrs時最低為0.11 umpi/mg protein/15 min，其值為Total ATPase activity的6-15%。

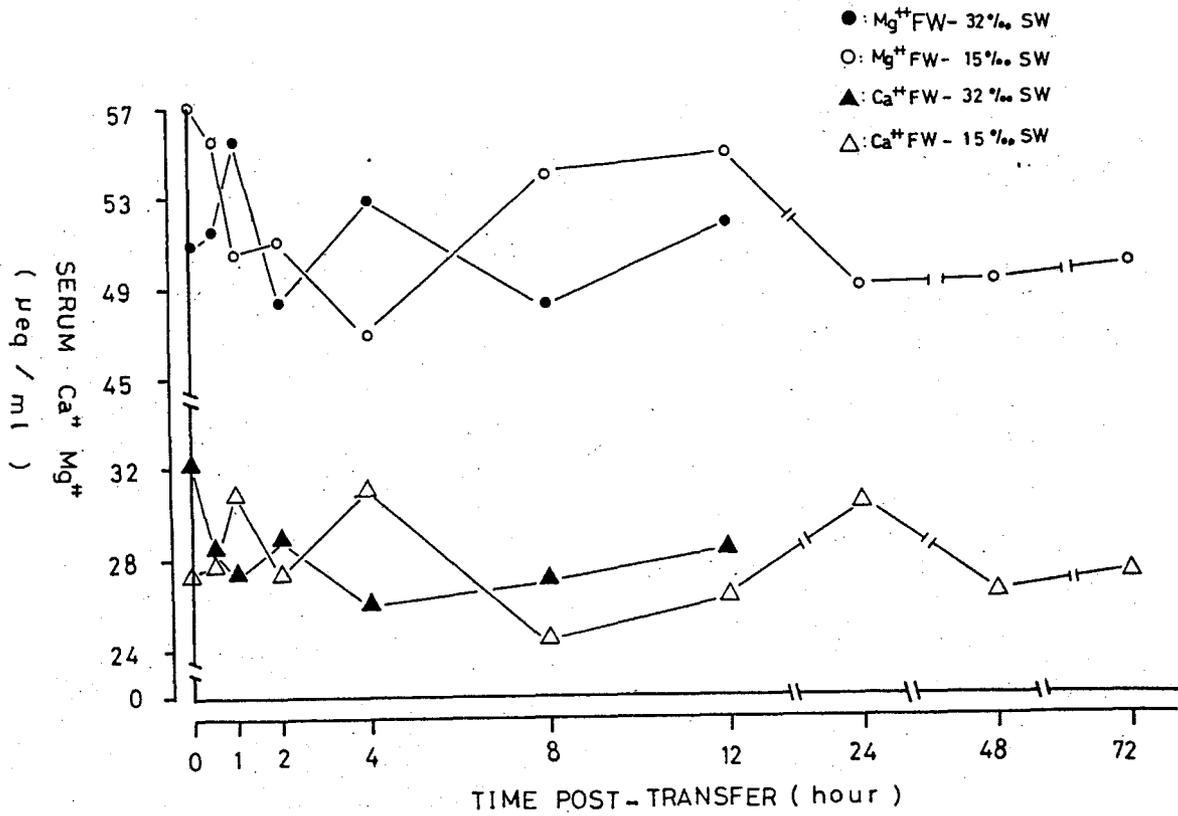


圖4 從淡水到海水肌肉之Ca²⁺及Mg²⁺變化狀況

Fig. 4. Serum Ca²⁺, Mg²⁺ change from fresh water to sea water

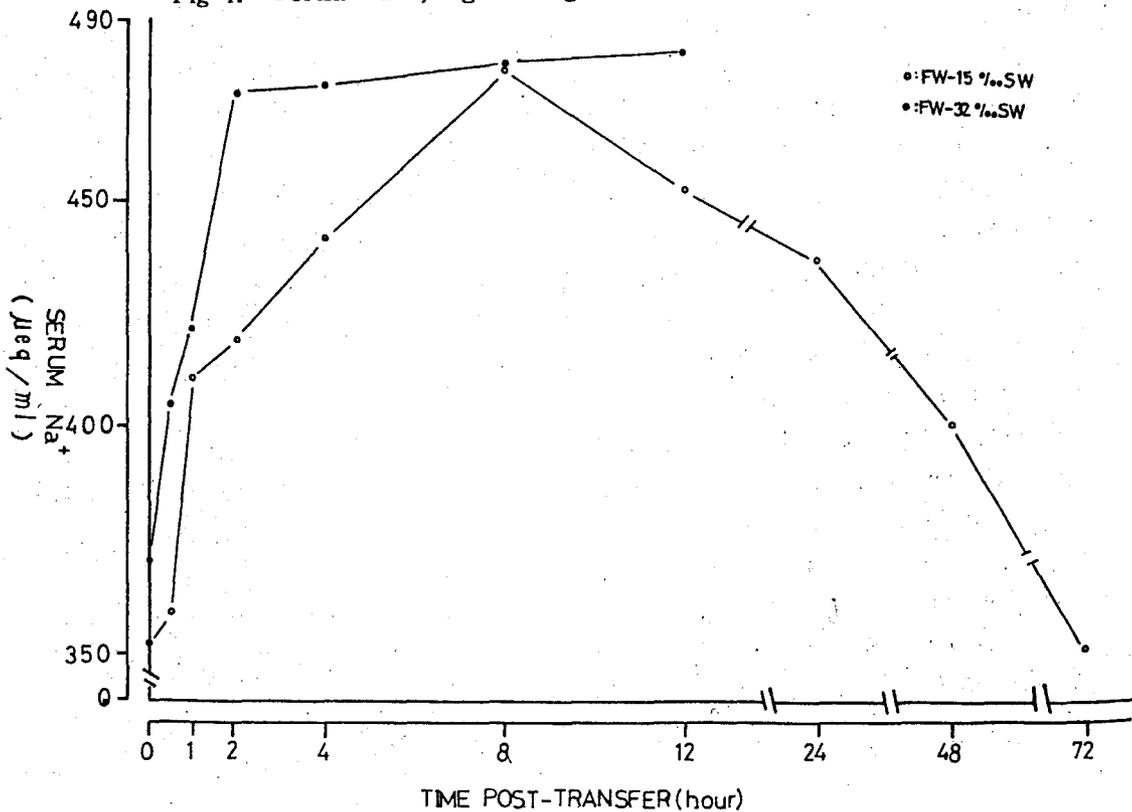


圖5 由淡水至海水肌肉Na離子變化情形

Fig. 5 Serum Na⁺ chang from fresh water to sea water

(二)水分及肌肉離子的測定

魚由淡水移入鹽度 15‰ 的海水中其肌肉含水量的變化如圖 3 所示，在 0 ~ 12 hrs 間，肌肉的含水量會隨著處理時間增加而降低，亦即水分不斷的自體內散失，肌肉的含水量由 78.76 % 下降至 74.49 %，而後肌肉的含水量乃逐漸的回復，在 72 hrs 時肌肉的含水量回復至 76.48 %，和在淡水中僅差 0.3 %。

魚由淡水移入鹽度 15‰ 的海水中其 Mg^{2+} ， Ca^{2+} 之變化如圖 4 所示， Ca^{2+} 及 Mg^{2+} 並不隨處理時間增加而下降或上升，而在一定值間變動， Ca^{2+} 在 32.50 ueq/mg 至 24.66 ueq/mg 中變動， Mg^{2+} 在 56.94 ueq/mg 至 46.94 ueq/mg 中變動， Mg^{2+} 的量約為 Ca^{2+} 的 2 倍。

魚由淡水移入鹽度 15‰ 的海水中其 Na^+ 之變化如圖 5 所示，在 0 ~ 12 hrs 間一價的 Na^+ 會隨處理時間增加而增加由 0 hrs 的 352.48 ueq/mg 升至 12 hrs 的 478.84 ueq/mg 而後處理時間在增加 Na^+ 會下降，在 72 hrs 時降至 352.48 ueq/mg，和在淡水中 (0 hrs) 相同。

討 論

Killfish 在鹽度 32‰ 海水中馴化時，Na-K activated ATPase 活性會顯著的增加，Na-K ATPase 在海水中具有排除鈉離子的功能，在淡水中則具有吸收鈉離子的作用⁽¹⁾。如圖 2 所示，Na-K ATPase 的活性，魚由淡水進入鹽度 32‰ 的海水中比進入 15‰ 海水中高出甚多。進入鹽度 32‰ 海水中的 Na-K 在 4 hrs 即達 0.48 umpi / mg pritein / 15 min 比在鹽度 15‰ 的 12 hrs 0.46 umpi / mg protein / 15 min 還高，但由於水分不斷的散失及 Na^+ 的不斷增加，魚無法適時適當的調整體內水分和離子濃度，滲透壓乃產生失調現象，滲透壓產生失調現象，Na-K ATPase activity 乃產生急速下降，調節滲透壓的能力降低，在鹽度 32‰ 海水中的魚無法適應於是發生死亡現象，在鹽度 15‰ 海水中的魚其 Na-K ATPase activity 在 12 hrs 前會隨著處理時間增加而增加，在 12 hrs 後，activity 下降，此時體內水分含量增加， Na^+ 下降，表示魚能適應此種鹽度，滲透壓能適當的調整，於是魚即能在此鹽度下生存下去。

在海水中馴化的 Rainbow trout 及 Cat fish 其肌肉中的離子會增加，水分會散失，一般魚類若適應其可容忍的鹽度範圍內之環境後，其體內水分和離子濃度大部份均會恢復至原來穩定的狀態⁽²⁾，*Oreochromis aureus* 若失水達 10 % 以上時，魚即會死亡⁽³⁾。由圖 3、4 當魚由淡水轉入鹽度 32‰ 海水時，肌肉內的 Na 離子不斷上升，同時體內的水分亦不斷的散失，在 12 hrs 即發生死亡，因此時水分量散失已達 10 % 以上。在鹽度 32‰ 的海水中，魚無法適應此鹽度環度，水分及離子當不會恢復其原來穩定的狀況。在由淡水轉入 15‰ 海水時，初期其肌肉中的 Na 離子不斷的上升，水分不斷的散失，但鹽度 15‰ 的海水是魚可容忍適應的鹽度環境範圍，於是在 12 hrs 後魚即開始使其體內的 Na 離子濃度下降，水分含量增加，在 72 hrs 達到和淡水相同穩定的狀態。

Oreochromis aureus 在鹽度 32‰ 海水中，其體內離子濃度及滲透壓均顯著的增加，而肌肉含水量亦相對的減少，在 4 hrs 後便因陸續無法適時調節以致滲透壓失調而死亡⁽⁴⁾。本次實驗利用 *O. niloticus* (♀) 和 *O. aureus* (♂) 雜交產出之第一子代雄性單性魚苗為實驗魚，其在鹽度 32‰ 海水中，其體內之離子濃度及滲透壓和 *O. aureus* 相似亦有顯著增加，水分亦是顯著下降，但是實驗魚在 12 hrs 後才會因滲透壓失調而死亡，較 *O. aureus* 在 4 hrs 即因滲透壓失調而死亡，時時長了 8 hrs。雜交魚對於鹽度耐性較純種魚高，因此可利用雜交魚作為海水中飼養的品種來源。

摘 要

Oreochromis niloticus (♀) 和 *O. aureus* (♂) 雜交產生的第一子代單性雄性子代，當移轉入 15‰ 海水中，其 Total 及 Na-K ATPase activity，鈉離子皆是先隨處理時間增加而增大，以 12 hrs 為轉折點，開始下降，72 hrs 恢復至淡水的狀況。體內的水分則隨處理時間增加而散失量增加，亦以 12

hrs 為轉折點，水分開始增加，72 hrs 恢復原來水準。當移轉入鹽度 32 ‰ 海水中 Total ATPase activity 在 4 hrs 時達最高點後急速下降，鈉離子則不斷上升，水分不斷的散失，散失重可達 10% 以上，12 hrs 魚即開始發生死亡。

謝 辭

本研究承省水產試驗所所長李燦然博士、台大客座教授郭欽明博士指導中山大學羅文增先生提供參考資料，工作期也承分所同仁協助，謹於此致謝意。

參考文獻

1. To Wle, D. W., M. E. Cilman and J. D. Hempel (1978). Rapid modulation of gill Na^+ -K-dependent ATPase activity during acclimation of the killfish, *Fundulus heteroclitus* to salinity change. *J. Exp. zool.* **202**, 179-186.
2. Eddy, F. B. and R. N. Bath (1979) Ionic regulation in rainbow trout, *salmo gairdneri* adapted to fresh water and dilute sea water. *J. Exp. Biol.* **83**, 181-192.
3. Utida, S., T. Hirano, M. oide, M. kamiya, S. sishu, and H. oide (1966), Na-k activated adenosine triphosphatase in gills and Cl^- -activated alkaline phosphatase in intestine mucosa with special reference to salt adaptation of eels. *Pro C. XI pacific Sci Congr.* (Tokyo) **7**(55), 5.
4. Jurss, K., T. Bittort, T. Vokler and R. wacke (1984). Biochemical investigations into the influence of environmental salinity on starvation of the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture* **40**, 171-182.
5. Lahlou, B., I. W. Henderson, and W. H. Sawyer (1969) Sodium exchanges in gold fish, *Carassius auratus* (L.) adapted to a hypertonic saline solution. *Comp. Biochem: physiol.* **28**, 1427-1433.
6. Karnaky, K. J. J., S. A. Ernst and C. W. philpot (1976) Teleost chloride cell. I. Response of pupfish *Cyprinodon variegatus* gill Na, k-ATPase and chloride cells time structure to various high salinity environments. *J. cell Biol.* **70**, 144-156.
7. Lowery, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol chem.* **193**, 265-275.
8. Bartlett, G. R. (1958) Phosphorous assay in column chromatography. *J. Biol. chem.* **234**, 466-468.
9. McBroom, M. J., Y. J. Lancaster and A. K. Weiss (1971) Measurement of tissue Calcium magnesium sodium and Potassium by flame spectrophotometry. *Anal Biochem*, **42**, 178-190.
10. Goswami, S. V., I. Parwez and B. I. sundaraj (1983) some aspects of osmoregulation in a steno haline fresh water catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch), in different salinities *J. Fish Biol*, **23**, 475-487.
11. 陳寶蓮 (1981) 吳郭魚 *Tilapia aurea* 鹽度適應之研究：腦下腺及腎臟之滲透壓調節功能的探訊。國立師範大學生物研究所碩士論文。
12. 羅文增 (1985) 吳郭魚 (*Oreochromis aureus*) 在不同鹽度的適應過程及其調節機制之研究，國立中山大學海洋生物研究所碩士論文。