

文章编号: 1674-5566(2011)05-0720-09

## pH胁迫对3种对虾存活率、离子转运酶和免疫酶活力的影响

赵先银<sup>1,2</sup>, 李健<sup>1</sup>, 陈萍<sup>1</sup>, 李吉涛<sup>1</sup>, 何玉英<sup>1</sup>, 常志强<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

**摘要:** 比较研究了中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)和日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)在对照组(pH 8.2)、低pH胁迫组(pH 7.2)和高pH胁迫组(pH 9.2)养殖水体条件下的存活率、鳃离子转运酶( $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ )活力及血淋巴iNOS、PO、SOD、GSH-PX、LSZ活性。结果表明: 对照组3种对虾的存活率整个实验期间均为100%; 低pH和高pH胁迫条件下, 日本囊对虾存活率分别为96.7%和97.0%; 凡纳滨对虾存活率分别为60.1%和54.6%, 中国明对虾的存活率分别为58.6%和13.3%。对照组条件下, 凡纳滨对虾鳃离子转运酶( $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ )活力最大, 中国明对虾其次, 日本囊对虾最小; 在低和高pH胁迫条件下, 中国明对虾鳃 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力变化幅度均比凡纳滨对虾大, 日本囊对虾的变化幅度最小, 并且3种对虾鳃 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力在高pH胁迫条件下变化幅度均较大。对照组条件下日本囊对虾和凡纳滨对虾血清中非特异性免疫酶活性均显著或极显著高于中国明对虾, 且日本囊对虾的PO、SOD活力分别显著、极显著高于凡纳滨对虾; 在低和高pH胁迫条件下, 中国明对虾和凡纳滨对虾血清非特异性免疫酶的活力变化幅度均显著高于日本囊对虾。中国明对虾和凡纳滨对虾血清iNOS、SOD、GSH-PX、LSZ活力在低pH条件下变化幅度较大, 而PO活力在高pH条件下变化幅度较大。综合上述结果显示3种对虾相比, 日本囊对虾对pH胁迫的耐受性较强, 凡纳滨对虾次之, 中国明对虾较弱。

**研究亮点:** 目前国内外有关pH对中国明对虾、凡纳滨对虾、日本囊对虾存活率及离子转运酶、免疫酶相关方面的比较研究较少。本文通过pH胁迫对对虾存活率、离子转运酶和非特异性免疫酶活力的影响研究, 筛选与pH胁迫直接相关的生理指标; 通过比较对虾属中的中国明对虾、凡纳滨对虾和日本囊对虾对养殖环境的适应性, 为对虾养殖过程水质调控提供一定理论指导。

**关键词:** 中国明对虾; 凡纳滨对虾; 日本囊对虾; 存活率; pH;  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ ; 免疫相关酶

**中图分类号:** S 917; S 968.22  
**文献标志码:** A

水体pH常因养殖过程中大量换水、阴天暴雨、酸雨、浮游动植物种群的突然改变和残饵等因素的影响而变化, 其作为养殖水体的一种重要水质理化指标, 是水体化学性状和生命活动的综合反应, 直接影响虾类的渗透调节、生长和存活等生理机能, pH突变会对虾体的渗透调节功能造成胁迫, 使虾体的免疫能力下降, 生长受到抑制, 从而影响对虾养殖的经济效益<sup>[1]</sup>。

目前, 国内外关于pH对对虾离子转运酶调

控和渗透调节<sup>[2-6]</sup>、免疫力<sup>[7-10]</sup>等方面已有研究, 但有关中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)3种对虾相关方面的比较研究还未见报道, 人们注意到在实际生产中, 中国明对虾、凡纳滨对虾或者日本囊对虾对不良环境的抗逆能力有较大差别, 这可能与对虾的自身免疫机制及虾体对养殖环境的适应性有关。因此, 在同一养殖环境下比较3种养殖

收稿日期: 2011-01-06 修回日期: 2011-03-07

基金项目: 公益性农业行业科研专项(200803012); 科技部农业科技成果转化资金项目(2010GB23260589); 公益性农业行业科研专项(201103034)

作者简介: 赵先银(1984—), 女, 硕士研究生, 研究方向为环境毒理学。E-mail: zhaoxianyin@hotmail.com

通讯作者: 李健, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

对虾的生理适应情况、渗透调节能力和免疫能力,对于深入了解对虾的渗透调节机制、免疫协调能力及其虾体对 pH 应激的保护机制具有重大意义,从而为养殖实践中根据水体环境选择合适的放养对虾种类提供理论指导。

本文以养殖水体 pH 为变化因子,比较了在正常水体 pH 及 pH 胁迫条件下中国明对虾、日本囊对虾和凡纳滨对虾的存活率、离子转运酶、免疫酶活指标的变化,探讨 3 种对虾的渗透调节能力和非特异性免疫能力差异,为对虾健康养殖及抗逆性新品种培育的研究提供一定数据支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

实验用中国明对虾、日本囊对虾和凡纳滨对虾均取自青岛宝荣水产科技发展有限公司,选择体色正常,健康活泼,体长分别为(7.49±0.70) cm,(7.20±0.70) cm,(7.40±0.78) cm;体重分别为(5.30±1.09) g,(5.30±1.80) g,(5.60±1.31) g 的对虾进行实验。实验开始前暂养一周,水体盐度为 20,pH 为 8.2,温度为(29.8±1)℃,连续充气,日换水 1 次,换水量 1/3~1/2,投喂对虾配合饲料(青岛统一饲料农牧有限公司生产),每天投喂 4 次,投喂量为对虾体重的 4%。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 pH 浓度梯度的设置

实验在 200 L 的塑料桶中进行,每桶分别放养健康的中国明对虾、日本囊对虾和凡纳滨对虾 15 尾,实验分为对照组(pH 8.2)、低 pH 组(pH 7.2)和高 pH 组(pH 9.2),每种虾每个 pH 梯度均设 6 个平行,对照组使用正常的养殖海水,低 pH 组和高 pH 组分别通过向正常养殖海水中添加 1.0 mol/L HCL 或 1.0 mol/L NaOH 溶液来调节,水体 pH 值使用上海三信仪表公司 EC500 型 pH 计测定,实验期间 pH 变化幅度为±0.1。

在 pH 变化后 0、3、6、12、24、36、48、72、96 h 分别取每个 pH 梯度每种对虾 8 尾,采集血淋巴和鳃、肝胰腺样品。实验期间不换水,每隔 2 h 调节一次 pH,及时剔除死亡个体,记录死亡个体数量。

#### 1.2.2 样品制备

用 1 mL 无菌注射器从对虾头胸甲腹侧取血淋巴,注入到无菌的 1.5 mL 离心管中,保存于

-20℃,注射器中预先加入已消毒的预冷抗凝剂(柠檬酸钠 7.949 g/L, NaCl 19.6 g/L,葡萄糖 22.8 g/L,EDTA-Na 23.3 g/L),使血液与抗凝剂最终比例为 1:1。用无菌镊子取对虾的鳃丝放入 1.5 mL 离心管中,-20℃保存备用。对虾血淋巴低温离心(4℃,3 000 r/min)10 min,血清用于诱导型一氧化氮合成酶、酚氧化酶、溶菌酶、超氧化物歧化酶及谷胱甘肽过氧化物酶的测定。取 1 g 鳃丝加入 9 mL PBS 缓冲液 10 倍稀释,匀浆之后,低温离心(4℃,5 000 r/min)10 min,上清用于酶活测定。

### 1.3 养殖水体不同 pH 条件下 3 种对虾各时间点的存活率

实验过程中,随时观察对虾的存活情况,发现死亡个体及时取出,并记录各 pH 组死亡个体数量。

### 1.4 对虾鳃丝 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 酶活力的测定

采用南京建成生物工程研究所试剂盒的测定方法。定义每小时每毫克组织蛋白的组织中 ATP 酶分解产生 1 μmol 无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位。即微摩尔磷/(毫克蛋白·小时)[μmolP/(mgprot·h)]。

### 1.5 对虾血清非特异性免疫因子的测定

#### 1.5.1 诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)的测定

采用南京建成生物工程研究所试剂盒的测定方法进行测定。定义每毫升血清每分钟生成 1 nmol NO 为一个酶活力单位。

#### 1.5.2 酚氧化酶活力(PO)的测定

以 L-DOPA 为底物,按照雷质文等<sup>[11]</sup>改进 Ashida 的方法测定。

#### 1.5.3 溶菌酶(LSZ)活力的测定

以溶壁微球菌为底物,采用王雷等<sup>[12]</sup>改进的方法进行。

#### 1.5.4 超氧化物歧化酶(SOD)活力的测定

采用南京建成生物工程研究所试剂盒的测定方法进行测定。定义每毫升反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个 SOD 活力单位(U)。

#### 1.5.5 谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-PX)活力的测定

采用南京建成生物工程研究所试剂盒的测定方法进行测定。规定每 0.1 mL 血清在 37℃ 反应 5 min,扣除非酶促反应作用,使反应体系中

还原型谷胱甘肽(GSH)浓度降低 1  $\mu\text{mol/L}$  为一个酶活力单位。

### 1.6 数据分析

利用 SPSS 11.5 和 Excel 软件进行数据处理、方差分析(ANOVA)和均值多重比较分析法(LSD法)。

## 2 结果与分析

### 2.1 存活率

3种对虾在不同 pH 条件下各时间点的存活率结果见图 1。对照组(pH 8.2)3种对虾在试验期间(96 h)均未出现死亡现象。在低 pH (pH 7.2)条件下,随着时间的逐渐延长,3种对虾的存

活率均呈下降趋势,中国明对虾和凡纳滨对虾在 6 h 开始下降,而日本囊对虾则在 24 h 开始下降;96 h 时,中国明对虾、凡纳滨对虾和日本囊对虾的存活率分别为 58.6%、60.1% 和 96.7%,均显著低于各自的对照组( $P < 0.05$ );在高 pH (pH 9.2)条件下,中国明对虾和凡纳滨对虾的存活率开始出现下降的时间在 3 h,而日本囊对虾则在 48 h;高 pH 胁迫组 96 h 时中国明对虾、凡纳滨对虾和日本囊对虾的存活率分别为 13.3%、54.6% 和 97.0%,均显著低于各自的对照组( $P < 0.05$ );两个胁迫组相比,3种对虾高 pH 胁迫组存活率下降幅度均较低 pH 胁迫组大。

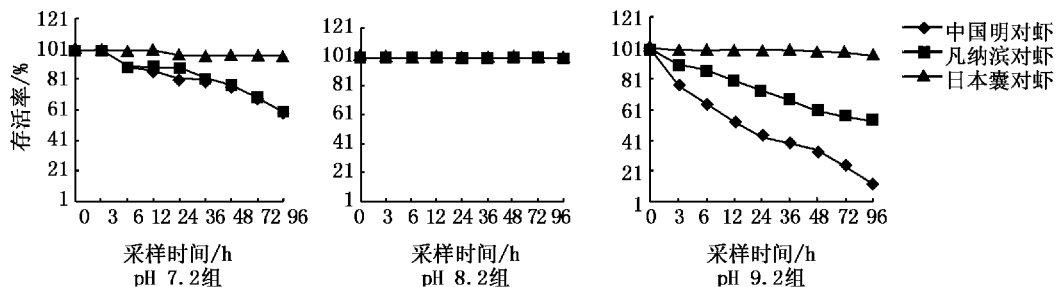


图 1 3种养殖对虾在不同 pH 水体中的存活率

Fig.1 The survival rate of three species of shrimps under different pH conditions

### 2.2 对虾鳃 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力

不同 pH 条件下 3 种对虾鳃  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  活力见图 2。对照组中国明对虾、凡纳滨对虾和日本囊对虾的鳃  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  活力大小依次为: 2.88、7.89、1.41 [ $\mu\text{mol}/(\text{mgprot} \cdot \text{h})$ ] 3 种对虾之间差异极显著( $P < 0.01$ )。与各自的对照组相比,低 pH 组随着时间的延长 3 种对虾鳃  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  活力均呈先增后减的变化规律,且中国明对虾、凡纳滨对虾、日本囊对虾分别在 3 h ( $P < 0.01$ )、6 h ( $P < 0.01$ )、12 h ( $P < 0.01$ ) 达到最大值,分别为: 11.28、11.40、3.49 [ $\mu\text{mol}/(\text{mgprot} \cdot \text{h})$ ],随后均逐渐下降;高 pH 胁迫组,3 种对虾鳃  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  活力也呈相似的变化趋势,中国明对虾、凡纳滨对虾、日本囊对虾分别在胁迫后 3 h ( $P < 0.01$ )、12 h ( $P < 0.01$ )、3 h ( $P < 0.01$ ) 达到最大值,分别为: 16.25、13.95、2.88 [ $\mu\text{mol}/(\text{mgprot} \cdot \text{h})$ ],随后逐渐下降。低和高 pH 胁迫条件下,3 种对虾酶活力变化幅度大小为: 中国明对虾 > 凡纳滨对虾 > 日本囊对虾;两

个 pH 胁迫组相比,高 pH 胁迫组 3 种对虾鳃  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  活力变化幅度均较低 pH 胁迫组大。

### 2.3 pH 胁迫对 3 种对虾血清免疫酶活力的影响

#### 2.3.1 诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)活力

不同 pH 条件下 3 种对虾 iNOS 的活性结果见图 3。对照组的 中国明对虾、凡纳滨对虾、日本囊对虾 iNOS 活力大小依次为: 8.27、12.96、11.63 [ $\text{U}/(\text{mgprot} \cdot \text{h})$ ],且差异极显著( $P < 0.01$ )。低 pH 胁迫组与各自的对照组相比,随着胁迫时间的延长中国明对虾、凡纳滨对虾、日本囊对虾 3 种对虾血清的 iNOS 均表现出先升高后降低的趋势,且分别在 3 h ( $P < 0.05$ )、24 h ( $P < 0.05$ )、12 h ( $P < 0.01$ ) 时达到最大值,分别为: 11.90、16.41、12.38 [ $\text{U}/(\text{mgprot} \cdot \text{h})$ ],随后逐渐下降;高 pH 胁迫组与各自的对照组相比中国明对虾、凡纳滨对虾的 iNOS 活力随着时间延长逐渐下降,而日本囊对虾 iNOS 活力在 3 h ( $P <$

0.01)达到最大值,为 22.13 [U/(mgprot·h)],然后随着时间延长呈现降低的变化趋势。pH 条件改变后 3 种对虾血清 iNOS 变化幅度为:中国明对虾 > 凡纳滨对虾 > 日本囊对虾;两个 pH 胁迫组相比,低 pH 胁迫组中国明对虾和凡纳滨对虾的血清 iNOS 活力较高 pH 胁迫组变化幅度大,而日本囊对虾的血清 iNOS 活力相反。

### 2.3.2 酚氧化酶(PO)活力

不同 pH 条件下 3 种对虾 PO 活力见图 4。对照组的中国明对虾、凡纳滨对虾、日本囊对虾 PO 活力大小依次为:0.002 7、0.006 7、0.008 2 (U/mg),且差异极显著( $P < 0.01$ )。与各自的对照组相比,低 pH 胁迫组随着胁迫时间的延长,中国

对虾、凡纳滨对虾、日本囊对虾 PO 活力均呈先增后减的变化规律,且峰值都出现在 12 h ( $P < 0.01$ ),最大值分别为:0.011 0、0.022 0、0.034 5 (U/mg),之后 PO 活力逐渐下降;高 pH 组 3 种对虾的 PO 活力也呈现先增后减的变化规律,日本囊对虾在 12 h ( $P < 0.01$ )达到最大值(0.048 4 U/mg),而凡纳滨对虾和中国明对虾在 6 h ( $P < 0.01$ )达到最大值,分别为:0.011 9、0.039 0 (U/mg),随后均逐渐下降。pH 条件改变后 3 种对虾 PO 活力变化幅度大小依次为:中国明对虾 > 凡纳滨对虾 > 日本囊对虾;两 pH 胁迫组相比,高 pH 胁迫组 3 种对虾的 PO 活力均较低 pH 胁迫组变化幅度大。

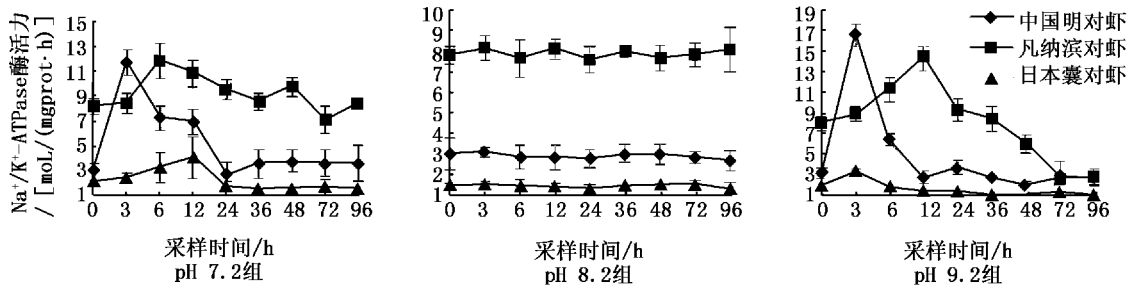


图 2 3 种养殖对虾在不同 pH 水体中的鳃 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 酶活力  
Fig. 2 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity gill of three species of shrimps under different pH conditions

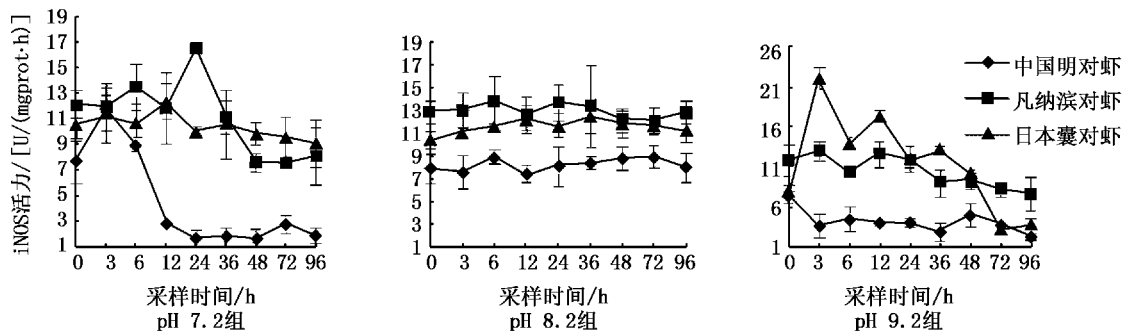


图 3 3 种养殖对虾在不同 pH 水体中的血淋巴 iNOS 酶活力  
Fig. 3 iNOS activity of blood of three species of shrimps under different pH conditions

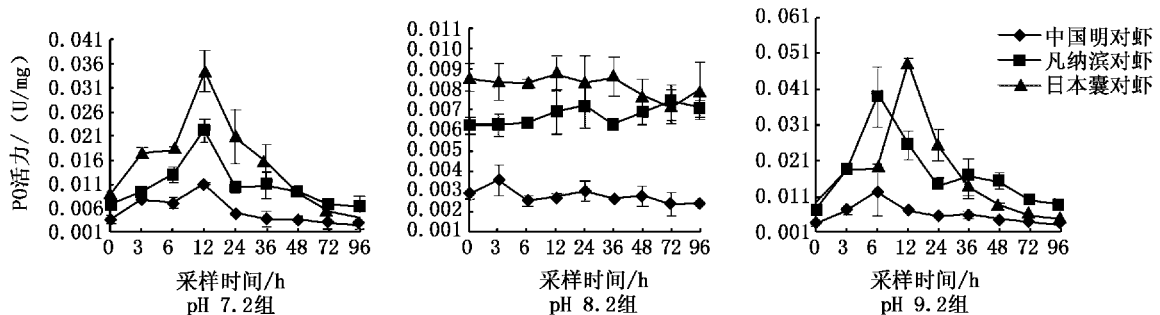


图 4 3 种养殖对虾在不同 pH 水体中的血淋巴 PO 酶活力  
Fig. 4 PO activity of blood of three species of shrimps under different pH conditions

### 2.3.3 溶菌酶(LSZ)

不同 pH 条件下 3 种对虾 LSZ 活力见图 5。对照组的中国明对虾、凡纳滨对虾、日本囊对虾 LSZ 活力大小依次为:0.058、0.086、0.074( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),且差异极显著( $P < 0.01$ )。与各自的对照组相比,低和高 pH 胁迫组随着胁迫时间的延长 3 种对虾的 LSZ 活力都呈逐渐下降的趋势且差异极显著( $P < 0.01$ )。3 种对虾血清 LSZ 活力在 96 h 内变化幅度依次为:凡纳滨对虾 > 中国明对虾 > 日本囊对虾;两个 pH 胁迫组相比,低 pH 胁迫组 3 种对虾的血淋巴 LSZ 活力均较高 pH 胁迫组变化幅度大。

### 2.3.4 超氧化物歧化酶(SOD)活力

不同 pH 条件下 3 种对虾超氧化物歧化酶(SOD)活力见图 6。对照组的中国明对虾、凡纳

滨对虾、日本囊对虾 SOD 活力大小依次为:94.81、109.69、175.56(U/mL),低和高 pH 胁迫组 3 种对虾 SOD 活力随着胁迫时间的延长均呈逐渐下降的趋势,且 96 h 后极显著地( $P < 0.01$ )低于初始水平。另外,高 pH 组日本囊对虾 SOD 活力的变化幅度明显高于低 pH 组,而中国明对虾和凡纳滨对虾却相反,表现为低 pH 条件下变化幅度更大的现象。pH 胁迫后 96 h 内 3 种对虾 SOD 变化幅度依次为:中国明对虾 > 凡纳滨对虾 > 日本囊对虾;两个 pH 胁迫组相比,中国明对虾和凡纳滨对虾的血淋巴 SOD 活力低 pH 胁迫组变化幅度较高 pH 胁迫组大,而日本囊对虾的血淋巴 SOD 活力高 pH 胁迫组变化幅度较低 pH 胁迫组大。

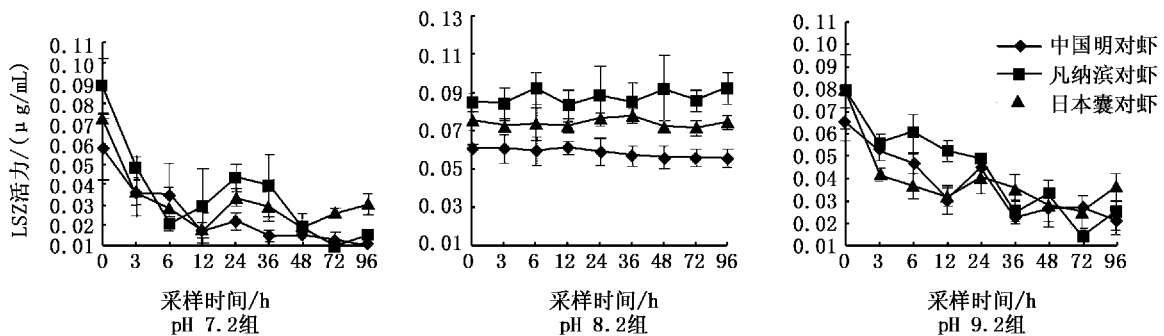


图 5 3 种养殖对虾在不同 pH 水体中的血淋巴 LSZ 酶活力

Fig. 5 LSZ activity of blood of three species of shrimps under different pH conditions

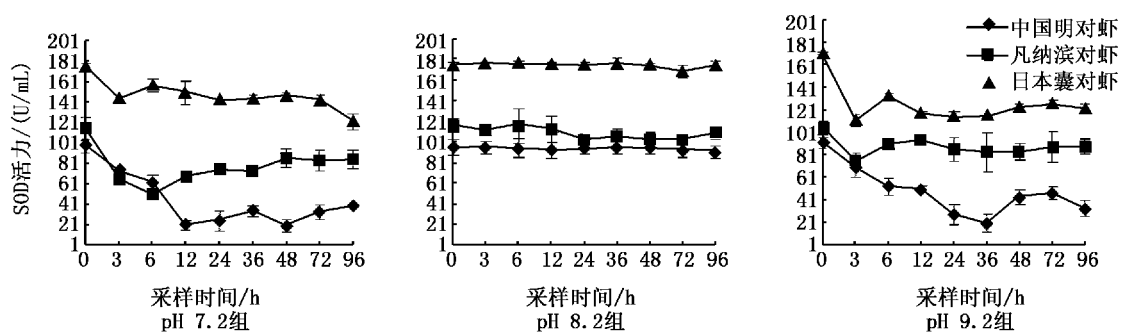


图 6 3 种养殖对虾在不同 pH 水体中的血淋巴 SOD 酶活力

Fig. 6 Blood SOD activity of three species of shrimps under different pH conditions

### 2.3.5 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)

不同 pH 条件下 3 种对虾血淋巴 GSH-PX 活力见图 7。对照组中国明对虾、凡纳滨对虾、日本囊对虾的 GSH-PX 活力大小依次为:372.00、295.41、616.53(U),且三者之间差异极显著

( $P < 0.01$ )。两胁迫组 3 种对虾血淋巴 GSH-PX 活力随着胁迫时间的延长均呈逐渐下降的趋势。pH 条件改变后 96 h 内 3 种对虾 GSH-PX 酶活力变化幅度依次为:日本囊对虾 > 中国明对虾 > 凡纳滨对虾;两个胁迫组相比,低 pH 胁迫组中国明

对虾血淋巴的 GSH-PX 活力变化幅度较高 pH 胁迫组大,而凡纳滨对虾和日本囊对虾血淋巴的

GSH-PX 活力高 pH 胁迫组较低 pH 胁迫组变化幅度大。

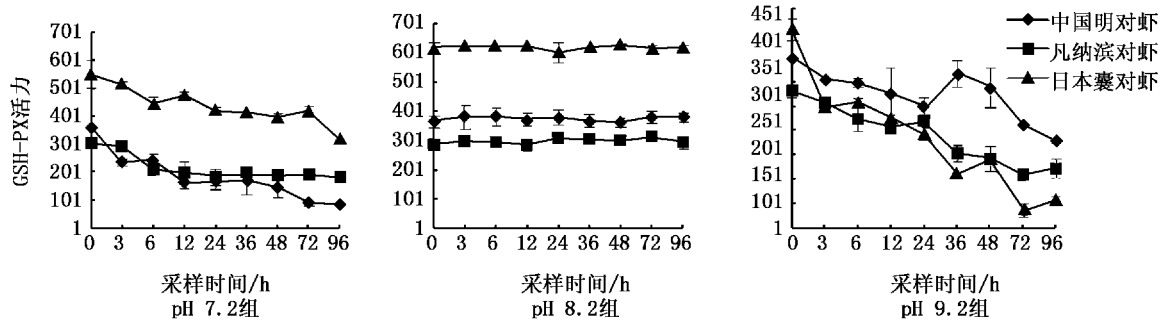


图7 三种养殖对虾在不同 pH 水体中的血淋巴 GSH-PX 酶活力

Fig. 7 Blood GSH-PX activity of three species of shrimps under different pH conditions

### 3 讨论

#### 3.1 3种对虾不同 pH 条件下各时间点的存活率

从本研究的结果可以看出,与各自的对照组相比,低和高 pH 胁迫都会使 3 种对虾的存活率随着 pH 改变时间的延长而逐渐下降,而且中国明对虾和凡纳滨对虾出现死亡个体的时间均较日本囊对虾早,高 pH 条件下 3 种对虾存活率下降的幅度大小依次为:中国明对虾 > 凡纳滨对虾 > 日本囊对虾;低 pH 条件下表现出同样的现象;两个胁迫组之间相比,高 pH 胁迫组的存活率下降幅度比低 pH 胁迫组大,由此可以推测高 pH 胁迫较低 pH 胁迫危害更大;3 种对虾相比,日本囊对虾对 pH 胁迫的耐受性较强,耐受范围较广,凡纳滨对虾次之,中国明对虾耐受性较差,这与目前养殖成活率实际情况相吻合,并且李少菁等<sup>[13]</sup> 报道日本对虾仔虾的死亡率与重金属浓度对数呈显著的正相关,但仔虾对离子的调节能力很强,可通过一定的调节机制抵消盐度等理化因子对金属摄入速率的影响,在最适的盐度范围内,日本囊对虾仔虾对重金属的耐受性最强,而哈承旭等<sup>[10]</sup> 报道的高 pH (pH 9.4) 胁迫 72 h 中国对虾全部死亡,以上研究与本实验的研究报道结果一致。

#### 3.2 pH 胁迫对 3 种对虾鳃 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力的影响

$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  存在于一切动物细胞膜上,参与细胞膜两侧的  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  离子的跨膜主动运

输。自 QUINN 和 LANE<sup>[14]</sup> 首次报道了甲壳动物鳃上皮存在  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  后,从此开始了对甲壳动物  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  活性的研究<sup>[15-17]</sup>。甲壳动物鳃上皮顶部细胞膜上具有  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  交换体系,水环境中的  $\text{Na}^+$  和细胞内代谢出来的  $\text{H}^+$  主要是通过此交换体系进行交换<sup>[5]</sup>; SHAW<sup>[18]</sup> 研究证实了当外界  $\text{H}^+$  浓度过高时,河螯虾 (*Astacus pallipes*) 吸收外界  $\text{Na}^+$  的能力下降,同时排泄鳃上皮细胞内  $\text{H}^+$  的能力也下降。

本实验中,3 种对虾鳃  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  活力都随着 pH 胁迫时间的延长而出现先升高后趋于稳定,这与潘鲁青等<sup>[17]</sup> 报道的凡纳滨对虾鳃丝  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  活力随着 pH 突变时间增加呈峰值变化结果一致。以上研究说明对虾对 pH 的变化具有一定的渗透调节能力,对虾机体为维持体内环境的 pH 平衡,短时间内鳃  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  活力升高,然后通过调节鳃上皮细胞的结构而改变离子的通透性,或者通过调节其它离子转运酶如碳酸酐酶 (参与  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  和  $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$  的交换运输) 活性等机制来适应 pH 变化,而使鳃  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  活力趋于稳定,由此增加了机体的能量消耗。林小涛等<sup>[19]</sup> 报道当水体中的 pH 值高于或低于某一范围时,都会改变甲壳动物的呼吸活动,影响鳃从外界吸收氧的能力,进而影响其耗氧率。在张林娟等<sup>[1]</sup> 的研究中也提到  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  酶参与了仔虾渗透调节过程,但对于甲壳动物鳃丝离子转运酶对环境胁迫的具体调节机制尚无定论,所以有关此方面的问题还需在多因素交互条件下,逐步深入研究加以论

证。从3种对虾鳃 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力变化幅度来看,日本囊对虾离子转运酶变化幅度较小,这可能与其耐干露、潜沙等生活生理习性有关,而凡纳滨对虾和中国明对虾离子转运酶变化幅度较大。

### 3.3 pH胁迫对3种对虾血淋巴免疫酶活力的影响

本实验对中国明对虾、凡纳滨对虾、日本囊对虾血清的iNOS、PO、SOD、LSZ、GSH-PX重要免疫因子进行了比较分析。发现低和高pH胁迫下日本囊对虾血清iNOS均表现出先增后减的趋势,其中高pH条件下酶活变化幅度较低pH条件变化大,这与吴无利等<sup>[20]</sup>报道的镉胁迫对凡纳滨对虾血清中一氧化氮合成酶的影响结果相似<sup>[9]</sup>。凡纳滨对虾和中国明对虾的低pH条件下iNOS活力先上升后下降,而高pH条件下iNOS活力则逐渐下降,这可能是由于高pH胁迫超出了对虾的耐受范围导致的。

本研究中3种对虾pH胁迫下的PO活力均呈现出先升高后降低的趋势,而且三者的高pH条件下PO活力变化幅度较低pH条件下的大,表现出高pH变化免疫适应性较差的现象,显然pH胁迫激活了对虾的酚氧化酶系统,使得PO活力升高,这虽是一种保护性反应但当这种应激达到一定强度或者长期处于应激状态下时,会导致虾体代谢紊乱,故又出现酶活力下降的趋势,这与SÖDERHELL等<sup>[21]</sup>的观点一致。

本实验中3种对虾血清的LSZ、SOD、GSH-PX活力均随pH变化时间的延长而降低。根据结果分析可知,3种对虾血清的LSZ在低pH条件下变化幅度较高pH条件下的大,且低和高pH条件下LSZ都随着pH变化时间的延长而下降,这与潘鲁青和姜令绪<sup>[9]</sup>报道的盐度、pH突变对中国明对虾和凡纳滨对虾免疫力的影响结果一致。

本研究中SOD活力逐渐下降,与LI和CHEN<sup>[22]</sup>研究低和高pH条件对凡纳滨对虾免疫因子的影响结果相似,这可能是由于pH应激强度过大导致对虾机体代谢紊乱,使得虾体的免疫机能受到抑制,酶活力下降,在哈承旭等<sup>[23]</sup>、黄旭雄等<sup>[24]</sup>的报道中SOD活力总趋势先升高后降低说明当生物体受到外界刺激后,其活性会在一定范围内升高,这是生物体产生的一种保护机制,

但若生物体持续地处于应激状态或应激强度加大时,机体的免疫功能会受到抑制,SOD活性降低<sup>[25]</sup>,这和本实验结果并不矛盾。

GSH-PX是机体内广泛存在的一种催化过氧化氢分解的酶,可以起到保护细胞膜结构和功能完整的作用<sup>[26-27]</sup>。本实验中GSH-PX的下降表明pH胁迫后,对虾非特异免疫功能下降,抗氧化能力降低。

综上所述,高pH胁迫较低pH胁迫对3种对虾的存活率影响大,pH改变后中国明对虾鳃 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力、血淋巴PO、SOD变化幅度较大并表现高pH变化适应性较差的趋势,这种变化趋势与高pH胁迫状态下中国明对虾死亡率的结果一致,因此推测对虾 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力、PO、SOD活力与pH胁迫更相关,但是3种生理指标之间哪个先起作用及详细的协调途径还需更加深入研究;3种对虾相比,日本囊对虾存活率下降较低,离子转运酶、非特异性免疫酶活力变化幅度较小,对pH胁迫耐受性较强,凡纳滨对虾其次,中国对虾最弱。

### 参考文献:

- [1] 张林娟,潘鲁青,栾治华. pH变化对日本囊对虾仔虾离子转运酶活力和存活、生长的影响[J]. 水产学报,2008,32(5):758-762.
- [2] ALLAN G L, MAGUIRE G B. Effect of pH and salinity on survival, growth and osmoregulation in *Penaeus monodon* Fabricius[J]. Aquaculture, 1992, 107(1):33-47.
- [3] MORRIS S, EDWARDS T. Control of osmoregulation via regulation of  $\text{Na}^+ / \text{K}^+ - \text{ATPase}$  activity in the amphibious purple shore crab *Leptograpsus variegates* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1995, 112(2):129-136.
- [4] 潘鲁青,刘志,姜令绪. 盐度、pH变化对凡纳滨对虾鳃 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力的影响[J]. 中国海洋大学学报,2004,34(5):787-790.
- [5] PEQUEUX A. Osmotic regulation in crustaceans-Review[J]. Crustacean Biol. 1995, 15(1):1-60.
- [6] WANG W N, WANG L, Chen L. Effects of pH on survival, phosphorus concentration adenylate energy charge and  $\text{Na}^+ / \text{K}^+ - \text{ATPase}$  activities of *Penaeus chinensis* Osbeck juveniles [J]. Aquatic Toxicology. 2002, 60(1/2) 75-83.
- [7] GILLES L M, PHILIPPE H. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea[J]. Aquaculture, 2000, 191(1/3):121-131.
- [8] CHENG W, CHEN J C. Effect of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Fish Shellfish Immunology, 2000, 10(4):

- 387-391.
- [9] 潘鲁青,姜令绪. 盐度、pH突变对2种养殖对虾免疫力的影响[J]. 青岛海洋大学学报,2002,32(6):903-910.
- [10] 哈承旭,刘萍,何玉英,等. 高pH胁迫对“黄海1号”中国明对虾免疫相关酶的影响[J]. 中国水产科学,2009,16(2):303-306.
- [11] 雷质文,黄健,杨冰,等. 感染白斑综合症病毒(WSSV)对虾相关免疫因子的研究[J]. 中国水产科学,2001,8(4):46-51.
- [12] 王雷,李光友,毛远兴. 中国明对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力与酚氧化酶活力的测定及其特性研究[J]. 海洋与湖沼,1995,26(2):179-185.
- [13] 李少菁,王桂忠,翁卫华,等. 重金属对日本对虾仔虾存活及代谢酶活力的影响[J]. 台湾海峡,1998,17(2):115-120.
- [14] QUINN D J,LANE C E. Ionic regulation and Na,K-stimulated ATPase activity in the land crab *Cardiosoma guanhumi* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1966, 19(3):533-543.
- [15] 房文红,王慧,来琦芳,等. 斑节对虾鳃  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 的活性[J]. 上海水产大学学报,2001,10(2):140-144.
- [16] 吴众望,潘鲁青,张红霞,等. 重金属离子对凡纳滨对虾鳃丝  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 活力的影响[J]. 海洋环境科学,2004,23(3):27-29.
- [17] 潘鲁青,刘志,姜令绪. 盐度、pH变化对凡纳滨对虾鳃丝  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 活力的影响[J]. 中国海洋大学学报,2004,34(5):787-790.
- [18] SHAW J. The absorption of sodium ions by the crayfish *Astacus pallipes* lereboullet. III. The effect of other cations in the external solution[J]. *Journal of Experimental Biology*, 1960, 37(3):548-556.
- [19] 林小涛,张秋明,许忠能,等. 虾蟹类呼吸代谢研究进展[J]. 水产学报,2000,24(6):575-580.
- [20] 吴无利,李广丽,师尚丽,等. 镉胁迫对凡纳滨对虾血清中一氧化氮合成酶和超氧化物歧化酶活性的影响[J]. 热带海洋学报,2008,27(6):62-65.
- [21] SÖDERHELL K, ASPUN A, DUVIC B. The proPO system and associated protein role in cellular communication in arthropods[J]. *Research in Immunology*, 1990, 141(9):896-907.
- [22] LI C C, CHEN J C. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to vibrio alginolyticus under low and high pH stress [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2008, 25(6):701-709.
- [23] 哈承旭,刘萍,何玉英,等. 氯化铵对“黄海1号”中国明对虾免疫相关酶类的影响[J]. 渔业科学进展,2009,30(1):34-40.
- [24] 黄旭雄,周洪琪,宋理. 急性感染对中国明对虾非特异性免疫水平的影响[J]. 水生生物学报,2007,31(3):325-330.
- [25] 王文博,李爱华. 环境胁迫对鱼类免疫系统影响的研究概括[J]. 水产学报,2002,26(4):368-374.
- [26] 王雷,李光友,毛远兴. 口服免疫药物后中国明对虾某些血淋巴因子的测定及方法研究[J]. 海洋与湖沼,1994,26(5):486-490.
- [27] CHEN J C, CHIA P G. Osmotic and ionic concentration of *Scylla serrata* (Forskål) subjected to different salinity levels [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1997, 117(2):239-244.



## Effects of pH stress on survival rate and activities of ion-transport enzyme, immune-related enzymes in three species of shrimps

ZHAO Xian-yin<sup>1,2</sup>, LI Jian<sup>1</sup>, CHEN Ping<sup>1</sup>, LI Ji-tao<sup>1</sup>, HE Yu-ying<sup>1</sup>, CHANG Zhi-qiang<sup>1</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, Shandong, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** The survival rate, gill  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  activities and serum iNOS, PO, SOD, GSH-PX, LSZ activities were compared in *Fenneropenaeus chinensis*, *Litopenaeus vannamei* and *Marsupenaeus japonicus* which were reared under control group (pH 8.2), low (pH 7.2), and high (pH 9.2) pH stress conditions in this study. Results showed that there were no negative effects among three species of shrimps when reared in the control group for 96 h. Under low or high pH stress conditions, the survival rates of *M. japonicus*, *L. vannamei* and *F. chinensis* for 96 h were 96.7% and 97.0%, 60.1% and 54.6%, 58.6% and 13.3%, respectively. With respect to gill  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  activity, *L. vannamei* showed highest level and *M. japonicus* was lowest in control group. The change in gill  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  activity of *F. chinensis* was the biggest. But that of *M. japonicus* was smallest under both low and high pH stress conditions. Also, all three species of shrimps tend to change much more in gill  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  activity under pH 9.2. In the control, the activities of nonspecific immunity-related enzymes of both *L. vannamei* and *M. japonicus* were significantly higher than that of *F. chinensis* and PO and SOD activities of *M. japonicus* were markedly higher than that of *L. vannamei*, while the LSZ activity of *L. vannamei* was higher than that of *M. japonicus*. The changes in nonspecific immunity-related enzymatic activities for *F. chinensis* and *L. vannamei* were much higher than that for *M. japonicus* both in low and high pH stress conditions for 96 h. Serum iNOS, SOD, GSH-PX and LSZ activity in *F. chinensis* and *L. vannamei* tended to change much more than in *M. japonicus* under low pH stress. The data obtained in the study indicated that *M. japonicus* has the strongest tolerance for pH stress among three species, then *L. vannamei*, and *F. chinensis* was the lowest.

**Key words:** *Fenneropenaeus chinensis*; *Litopenaeus vannamei*; *Marsupenaeus japonicus*; survival rate; pH;  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ ; immune-related enzymes