



长期碳酸盐碱度胁迫对脊尾白虾生长及卵巢发育的影响

张秀红^{1,2}, 李吉涛^{2*}, 王佳佳², 王成伟², 秦桢²,
葛倩倩², 刘萍², 李健²

(1. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;
2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室,
青岛海洋科技中心海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 为探讨碳酸盐碱度对脊尾白虾生长及卵巢发育的影响。本研究设置 3 mmol/L (对照组)、5 mmol/L 和 8 mmol/L 三种碳酸盐碱度梯度养殖脊尾白虾 60 d, 比较不同碳酸盐碱度胁迫对脊尾白虾生长性能、组织结构、酶活性以及卵巢发育的影响, 结果显示, 5 mmol/L 组与对照组体长增长率、体重增长率以及成活率差异不显著, 8 mmol/L 组体长增长率、体重增长率以及成活率显著低于对照组。肝胰腺组织切片显示, 5 mmol/L 组中部分 B 细胞体积增大, 部分转运泡内出现颗粒物质, 8 mmol/L 组管腔的形态结构严重变形。鳃组织切片显示, 5 mmol/L 组出现轻微鳃丝肿大现象, 角质层略有变形, 且角质层下间隙扩张变长, 上皮细胞与支柱细胞排列紊乱; 8 mmol/L 组鳃丝肿大, 排列不规则, 出现血细胞肿胀现象, 鳃丝上皮细胞严重破坏, 毛细血管网结构形态改变, 角质层下间隙变形。肌肉组织酶活性测定结果显示, 5 mmol/L 组的碳酸酐酶活性显著高于对照组, Na^+/K^+ -ATP 酶活性在肌肉中差异不显著; 肝胰腺组织酶活性测定结果显示, 碳酸酐酶在肝胰腺组织中差异不显著, 8 mmol/L 组 Na^+/K^+ -ATP 酶活性显著低于其他组, 鳃组织中, 5 和 8 mmol/L 组鳃组织中和 Na^+/K^+ -ATP 酶活性均显著高于对照组, 且两组间差异显著。卵巢发育统计结果显示, 三组脊尾白虾卵巢均能发育, 其发育至 II 期的百分比分别为 20.51%、10.52% 和 6.25%, 其中 5 mmol/L 组与对照组间无显著差异, 8 mmol/L 组显著低于对照组; 3 mmol/L 组和 5 mmol/L 组均有卵巢发育至 III 期的脊尾白虾, 但两组差异不显著, 8 mmol/L 组未见有卵巢发育至 III 期的脊尾白虾。卵巢组织切片显示, 8 mmol/L 组卵原细胞细胞排列疏松, 周围滤泡细胞排列疏松且数量较少。研究表明, 脊尾白虾可以在低于 8 mmol/L 的碳酸盐碱度中生长发育, 但高碳酸盐碱度可能会造成脊尾白虾鳃和肝胰腺组织损伤, 导致其生长受到影响, 同时猜测高碳酸盐碱度可能也会影响卵巢的发育速率。本研究可为开展脊尾白虾在盐碱水中的增养殖提供基础数据和参考信息。

关键词: 脊尾白虾; 碳酸盐碱度胁迫; 生长; 组织切片; 酶活性; 卵巢发育

中图分类号: S 968.22

文献标志码: A

盐碱水是分布于陆地区域的非海洋性咸水资源, 全世界盐碱地面积为 95.4 万 km², 仅中国就

有 9.9 万 km² 盐碱地和 4.6 万 km² 低洼盐碱水域, 广泛分布在西北、东北、华北和长江北岸, 包括

收稿日期: 2022-04-01 修回日期: 2022-07-27

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFD0901302); 国家自然科学基金(32072974); 现代农业产业技术体系专项(CARS-48); 中国水产科学研究院基本科研业务费(2023TD50)

第一作者: 张秀红(照片), 从事甲壳动物遗传育种研究, E-mail: 2381739677@qq.com

通信作者: 李吉涛, 从事甲壳动物遗传育种研究, E-mail: lijt@ysfri.ac.cn

版权所有 ©《水产学报》编辑部 (CC BY-NC-ND 4.0)
中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

Copyright © Editorial Office of Journal of Fisheries of China (CC BY-NC-ND 4.0)
<https://www.china-fishery.cn>



青海、甘肃、河北、山东等 19 个省^[1-3]。盐碱水具有高碳酸盐碱度、高 pH、水质类型复杂以及主要离子比例失调等特点, 导致一般适应性弱的水产动物无法在其中正常生存和繁殖^[1, 4], 因此绝大部分盐碱水还处于闲置状态。长久以来, 碳酸盐碱度和盐度被认为是影响盐碱水中水生动物生存、生长和繁殖的主要应激源, 研究发现, 在碳酸盐碱度超过 15.7 mmol/L 的条件下, 青鳉 (*Oryzias latipes*) 的存活率降低, 并发生胚胎凝集、胚胎发育畸形、孵化停止等形态学畸形^[5]。房文红等^[6]研究发现, 中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 幼虾的成活率随着碳酸盐碱度的升高而降低; 尤琦等^[7]研究发现, 盐度和碱度对大银鱼 (*Protosalanx hyalocranius*) 的毒性为协同作用。Lin 等^[8]发现当碳酸盐碱度 >10 mmol/L, 且 pH>9.0 时, 青蛤 (*Cyclina sinensis*) 的存活率、体长增长率、体重增长率等均显著降低。然而有一部分水生动物由于具有较强的耐盐碱能力, 可长期生活在盐碱水域中, 如瓦氏雅罗鱼 (*Leuciscus waleckii*) 能够适应内蒙古达里湖碱度达 53.57 mmol/L、pH 9.6 的恶劣水域条件^[9]; 青海湖裸鲤 (*Gymnocypris przewalskii*) 能够通过鳃和肾脏的组织学变化进行渗透和离子调节以适应高盐碱环境^[10]。大鳞鲃 (*Barbus capito*) 能够通过调节代谢降低氨的产生量, 以及在体内将氨代谢合成尿素排出体外的方式应对碱度胁迫时的氨中毒^[11]。尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 可通过鳃离子细胞形态和数量调节适应碱度变化^[12]。凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 在高碳酸盐碱度胁迫下, 以增加离子调控的方式进行酸碱平衡的调控^[13]。

脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*) 因具有生长速率快、繁殖周期短、适应能力强等优点, 现已成为开展甲壳类盐碱适应性生理机制研究的理想材料。柳飞等^[14]研究发现, 在低碳酸盐碱度下脊尾白虾生长和繁殖均不受影响, 高碳酸盐碱度胁迫下脊尾白虾可以通过调节免疫酶的活性,

更好地适应高碳酸盐碱度环境。目前脊尾白虾已成功在滨海盐碱水域河北沧州和山东东营盐碱池塘养殖, 且能正常生长和繁殖, 并取得了明显的经济效益^[15]。关于脊尾白虾耐盐碱的研究大多集中在生长存活方面, 对于盐碱水对脊尾白虾繁殖的影响研究较少。因此, 本研究设置不同碳酸盐碱度长期胁迫脊尾白虾, 旨在探明碳酸盐碱度胁迫对脊尾白虾生长及卵巢发育的影响机理, 为开展脊尾白虾在盐碱水中的增养殖提供基础数据和参考信息。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的脊尾白虾来自山东省日照海辰水产有限公司, 挑选个体健壮、附肢完整、体表洁净、规格一致 [体长 (2.76±0.20) cm、体重 (0.12±0.08) g] 的雌虾用于胁迫实验。

1.2 实验设计

实验在 200 L 的白色 PVC 桶内进行, 将同批脊尾白虾雌虾随机分为 3 个组, 每组 3 个重复, 每个重复 50 尾。以自然海水 (盐度 25, 碳酸盐碱度 3 mmol/L) 为对照, 用 1 mol/L 的 NaHCO₃ 溶液调整碳酸盐碱度, 实验组每天升高 1 mmol/L 碳酸盐碱度, 直到调整实验用水的碳酸盐碱度分别为 5 和 8 mmol/L (表 1)。胁迫期间按体重的 3%~5% 进行饲料投喂, 每天投喂 2 次 (08: 00 和 18: 00), 投饵 1 h 后进行换水, 用虹吸管清除残饵和粪便, 每次换水不超过 1/3。采用酸碱滴定法测定碳酸盐碱度, 以溴甲酚绿-甲基红作为指示剂, 整个实验周期为 60 d。待实验结束后, 统计各组脊尾白虾数量以及卵巢发育情况, 然后从实验组和对照组取其肌肉、鳃、肝胰腺和卵巢组织, 一部分用组织固定液保存, 其余各组织迅速装入 1.5 mL 的离心管中放入液氮保存。实验过程中操作人员严格遵守实验动物伦理规范。

表 1 各实验组水体盐度和碳酸盐碱度

Tab. 1 Salinity and carbonate alkalinity of water in each treatment group

组别 group	预设盐度 preset salinity	预设碳酸盐碱度/(mmol/L) preset carbonate alkalinity	实测盐度 measured salinity	实测碳酸盐碱度/(mmol/L) measured carbonate alkalinity
3 mmol/L	25	3	25.54±0.98	3.01±0.48
5 mmol/L	25	5	25.82±0.78	4.69±0.85
8 mmol/L	25	8	25.77±0.73	7.94±0.54

1.3 检测指标与测定方法

实验期间每7天记录一次脊尾白虾体长和体重, 分别从每桶中随机抽取10尾脊尾白虾, 用滤纸吸干虾体表面水分, 电子天平称其重量(精确至0.01 g), 刻度尺测其体长(精确至0.01 cm)。

待生长实验结束后, 统计各组脊尾白虾卵巢发育至不同时期的数量。

$$(GG, \%) = 100\% \times (L_t - L_0) / L_0 \quad (1)$$

$$(WG, \%) = 100\% \times (W_t - W_0) / W_0 \quad (2)$$

$$(SR, \%) = 100\% \times (N_0 - N_t) / N_0 \quad (3)$$

式中, L_0 、 L_t 分别为实验开始及结束时脊尾白虾的体长(cm); W_0 、 W_t 分别为实验开始及结束时脊尾白虾的体重(g); N_0 、 N_t 分别为实验初始及结束时脊尾白虾的数量(尾)。

1.4 组织切片制作

用固定好的鳃、肝胰腺和卵巢和组织制备H.E染色石蜡组织切片。具体步骤: 将组织用4%多聚甲醛固定液固定, 24 h后转移至70%的乙醇中保存。制作切片时, 将组织进行梯度乙醇(80%乙醇1 h, 95%乙醇1 h, 100%乙醇1 h)脱水。经二甲苯透明[纯乙醇:二甲苯(体积比1:1)1 h, 二甲苯1 h], 并用石蜡渗透[二甲苯:石蜡(体积比1:1)62 °C 1 h, 石蜡62 °C 2 h]、包埋、切片。切片厚度为6 μm, H.E染色, 然后用中性树脂封片, 光学显微镜下观察切片组织学变化。

1.5 酶活性测定

碳酸酐酶和Na⁺/K⁺-ATP酶活性采用苏州科铭生物技术有限公司的试剂盒进行测定。准确称取0.1 g肝胰腺、鳃、肌肉组织, 按重量体积比1:10加入提取液, 进行冰浴匀浆, 8 000×g 4 °C离心10 min, 收集上清液置于冰上, 然后按试剂盒说明书进行测定, 使用酶标仪进行检测读数。

1.6 数据分析

所得实验数据用平均值±标准差(mean±SD)表示, 采用SPSS Statistics 22.0分析软件进单因素方差分析(One-Way ANOVA), 采用Duncan氏比较组间差异显著性, 以P<0.05为显著水平。

2 结果

2.1 碳酸盐碱度对脊尾白虾生长性能及卵巢发育的影响

生长前期碳酸盐碱度对脊尾白虾体长、体重均无显著影响(P>0.05), 42 d后, 5 mmol/L组体长与对照组差异不显著(P>0.05), 但体重与对照组差异显著(P<0.05)(表2, 表3)。8 mmol/L组体长、体重均与对照组差异显著(P<0.05)。5 mmol/L组GG、WG和SR与对照组差异不显著(P>0.05), 随水体碳酸盐碱度的上升, 即碳酸盐碱度为8 mmol/L时, 脊尾白虾的GG、WG和SR均显著低于对照组(P<0.05)(图1)。

三组脊尾白虾卵巢均能发育, 发育至Ⅱ期的

表2 碳酸盐碱度胁迫对脊尾白虾体长的影响

Tab. 2 Effect of carbonate alkalinity stress on length of *E. carinicauda*

分组 group	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	42 d	49 d	56 d
3 mmol/L	3.17±0.27 ^a	3.42±0.23 ^a	3.62±0.27 ^a	4.05±0.35 ^a	4.39±0.64 ^a	4.79±0.46 ^a	5.15±0.39 ^a	5.50±0.43 ^a
5 mmol/L	3.15±0.23 ^a	3.42±0.33 ^a	3.63±0.53 ^a	3.89±0.55 ^a	4.25±0.59 ^a	4.70±0.53 ^a	5.06±0.46 ^a	5.39±0.59 ^{ab}
8 mmol/L	3.12±0.28 ^a	3.35±0.37 ^a	3.77±0.34 ^a	4.03±0.40 ^a	4.34±0.39 ^a	4.62±0.44 ^a	4.86±0.40 ^b	5.21±0.43 ^b

注: 同一列不同上标字母表示各组间差异显著(P<0.05), 下同。

Notes: Different lowercase letters in the same column indicate that there is significant difference between groups (P<0.05), the same below.

表3 碳酸盐碱度胁迫对脊尾白虾体重的影响

Tab. 3 Effect of carbonate alkalinity stress on weight of *E. carinicauda*

分组 group	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	42 d	49 d	56 d
3 mmol/L	0.23±0.06 ^a	0.29±0.05 ^a	0.31±0.08 ^a	0.42±0.07 ^a	0.60±0.18 ^a	0.74±0.18 ^a	0.86±0.12 ^a	0.98±0.21 ^a
5 mmol/L	0.22±0.04 ^a	0.27±0.07 ^a	0.32±0.10 ^a	0.41±0.10 ^a	0.55±0.21 ^a	0.68±0.19 ^a	0.70±0.28 ^b	0.93±0.25 ^b
8 mmol/L	0.23±0.06 ^a	0.27±0.08 ^a	0.33±0.07 ^a	0.43±0.10 ^a	0.54±0.15 ^a	0.68±0.16 ^a	0.79±0.15 ^b	0.85±0.15 ^b

百分比分别为 20.51%、10.52% 和 6.25%，其中 5 mmol/L 组与对照组间无显著差异 ($P>0.05$)，8 mmol/L 组显著低于对照组 ($P<0.05$) (图 2-a)。对照

组和 5 mmol/L 组均有脊尾白虾卵巢发育至Ⅲ期，但两组差异不显著 ($P>0.05$)，8 mmol/L 组未见有卵巢发育至Ⅲ期 (图 2-b)。

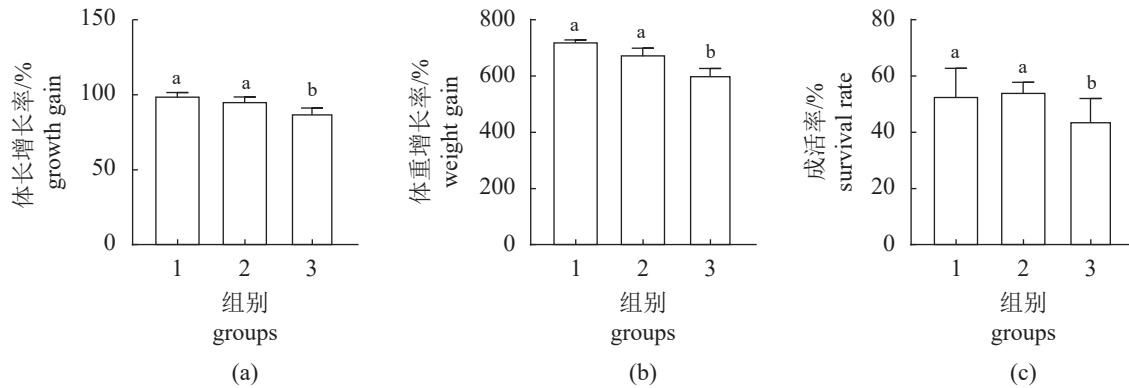


图 1 碳酸盐碱度胁迫对脊尾白虾生长性能的影响

1. 3 mmol/L, 2. 5 mmol/L, 3. 8 mmol/L. (a) 体长增长率; (b) 体重增长率; (c) 成活率; 不同字母表示差异显著 ($P<0.05$), 下同。

Fig. 1 Effects of carbonate alkalinity stress on growth performance of *E. carinicauda*

1. 3 mmol/L, 2. 5 mmol/L, 3. 8 mmol/L. (a) growth gain; (b) weight gain; (c) survival rate; different letters mean the difference is significant ($P<0.05$), the same below.

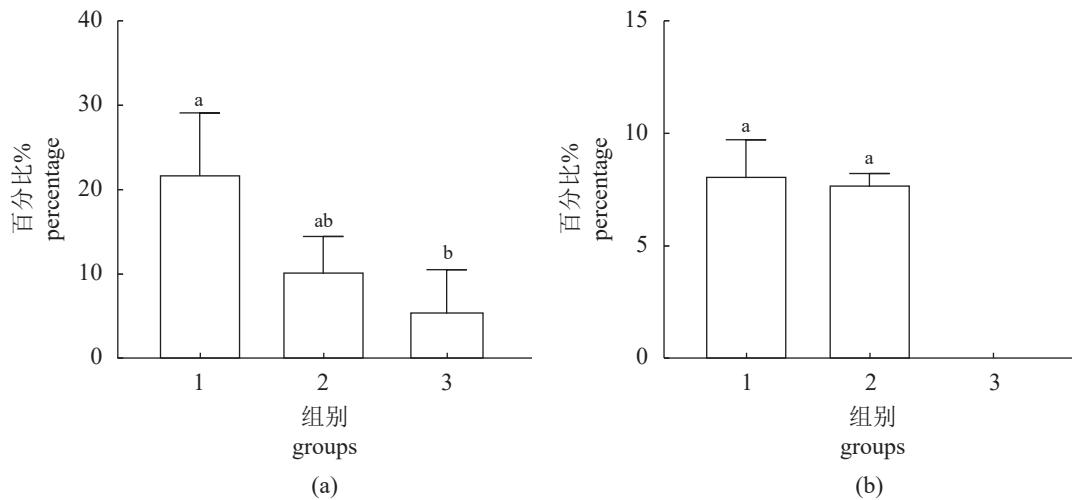


图 2 碳酸盐碱度胁迫对脊尾白虾卵巢发育的影响

(a) 各组卵巢发育至Ⅱ期的脊尾白虾数量百分比; (b) 各组卵巢发育至Ⅲ期的脊尾白虾数量百分比。

Fig. 2 Effects of carbonate alkalinity stress on ovary development of *E. carinicauda*

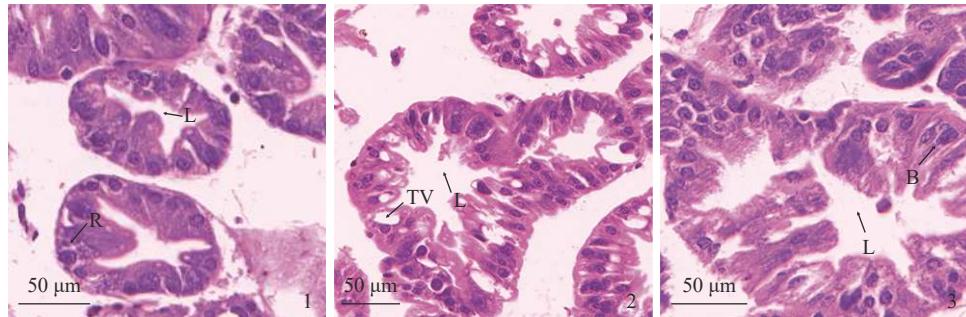
(a) percentage of *E. carinicauda* at stage II of ovary development in each group; (b) percentage of white *E. carinicauda* at stage III of ovary development in each group.

2.2 碳酸盐碱度对脊尾白虾组织结构的影响

碳酸盐碱度为 3 mmol/L 时，脊尾白虾肝胰腺组织中细胞结构正常且分布均匀，肝小管基膜完整，管腔呈星型，肝细胞结构正常且分布均匀 (图版 I -1)。碳酸盐碱度为 5 mmol/L 时，肝小管结构相对正常，管腔呈星型，B 细胞和 R 细胞分布均匀，部分 B 细胞体积增大，部分转运泡内出现颗粒物质 (图版 I -2)。碳酸盐碱度为 8 mmol/L 时，

管腔结构严重变形，细胞排列紊乱，R 细胞数量相对较少，B 细胞内部运转泡体积显著降低，转运泡内的颗粒物质明显增加，由于转运泡体积的增大而导致肝小管的形态结构发生变化 (图版 I -3)。

碳酸盐碱度为 3 mmol/L 时，脊尾白虾卵巢发育至Ⅰ期，卵原细胞呈卵形，处于增殖状态，细胞核圆形，多数细胞能观察到 1 个核仁，少数可观察到 2 个核仁，核仁染色最深，卵原细胞排列



图版 I 碳酸盐碱度胁迫对脊尾白虾肝胰腺组织结构的影响

1. 碳酸盐碱度 3 mmol/L (对照组); 2. 碳酸盐碱度 5 mmol/L; 3. 碳酸盐碱度 8 mmol/L, 下同。B. 分泌细胞, L. 管腔, R. 储存细胞, TV. 转运泡。

Plate I Effects of carbonate alkalinity stress on the structure of hepatopancreas of *E. carinicauda*

1. carbonate alkalinity 3 mmol/L (control group); 2. carbonate alkalinity 5 mmol/L; 3. carbonate alkalinity 8 mmol/L, the same below. B. secretory cells, L. lumen, R. storage cells, TV. transport vesicles.

紧密, 周围有单层紧密排列的滤泡细胞(图版 II - 1)。随着碳酸盐碱度的增加, 卵巢的发育速率有所减缓, 当碳酸盐碱度增加到 8 mmol/L 时, 卵巢

腔内细胞多为卵原细胞, 但卵原细胞排列疏松, 周围滤泡细胞排列疏松且数量较少(图版 II - c)。



图版 II 碳酸盐碱度胁迫对脊尾白虾卵巢组织结构的影响

N. 细胞核, Nu. 核仁, Fc. 滤泡细胞。

Plate II Effects of carbonate alkalinity stress on ovary tissue structure of *E. carinicauda*

N. nucleus, Nu. nucleolus, Fc. follicular cell.

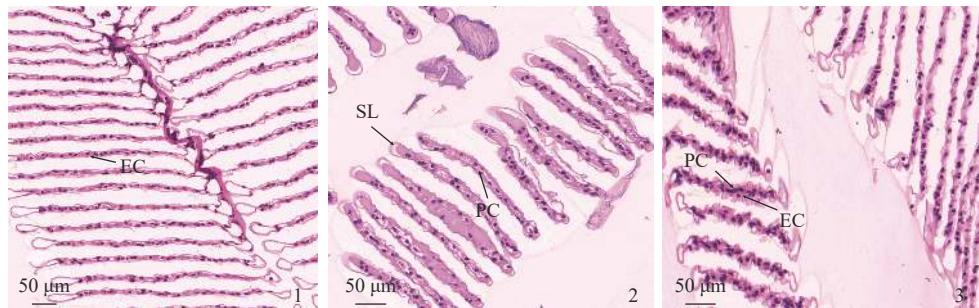
正常脊尾白虾鳃组织为叶状鳃, 鳃丝排列整齐、结构完整清晰, 呼吸上皮细胞及支柱细胞排列整齐, 细胞结构以及次级层片形态结构正常(图版 III - 1)。当碳酸盐碱度为 5 mmol/L 时, 脊尾白虾鳃丝排列紊乱, 出现轻微鳃丝肿大现象, 角质层略有变形, 角质层下间隙扩张变长, 上皮细胞与支柱细胞排列紊乱(图版 III - 2)。当碳酸盐碱度为 8 mmol/L 时, 脊尾白虾鳃丝肿大, 排列不规则, 出现血细胞肿胀现象, 鳃丝上皮细胞破坏, 空泡化严重, 毛细血管网结构形态改变, 角质层下间隙变形(图版 III - 3)。

2.3 碳酸盐碱度对脊尾白虾酶活性的影响

脊尾白虾体内碳酸酐酶活性依次是鳃>肝胰腺>肌肉(图 3)。肌肉组织中, 5 mmol/L 组的碳酸

酐酶活性与对照组差异显著($P<0.05$)(图 3-a)。碳酸酐酶在肝胰腺组织中差异不显著($P>0.05$)(图 3-b)。鳃组织中的碳酸酐酶活性随水体碳酸盐碱度的升高整体呈上升趋势, 5 mmol/L 和 8 mmol/L 组均显著高于 3 mmol/L 组($P<0.05$)(图 3-c)。

脊尾白虾体内 Na^+/K^+ -ATP 酶活性依次是鳃>肝胰腺>肌肉(图 4)。 Na^+/K^+ -ATP 酶在肌肉组织中差异不显著($P>0.05$)(图 4-a)。肝胰腺中, 8 mmol/L 组的 Na^+/K^+ -ATP 酶活性显著低于其他组($P<0.05$)(图 4-b)。鳃组织中的 Na^+/K^+ -ATP 酶活性随水体碳酸盐碱度的升高整体呈上升趋势, 其中 5 mmol/L 和 8 mmol/L 组的 Na^+/K^+ -ATP 酶活性显著高于 3 mmol/L 组($P<0.05$)(图 4-c), 且 5 mmol/L 组和 8 mmol/L 组之间差异显著($P<0.05$)。



图版 III 碳酸盐碱度胁迫对脊尾白虾鳃组织结构的影响

EC. 上皮细胞, PC. 支柱细胞, SL. 次级层片。

Plate III Effects of carbonate alkalinity stress on gill structure of *E. carinicauda*

EC. epithelial cells, PC. pillar cell, SL. secondary slice.

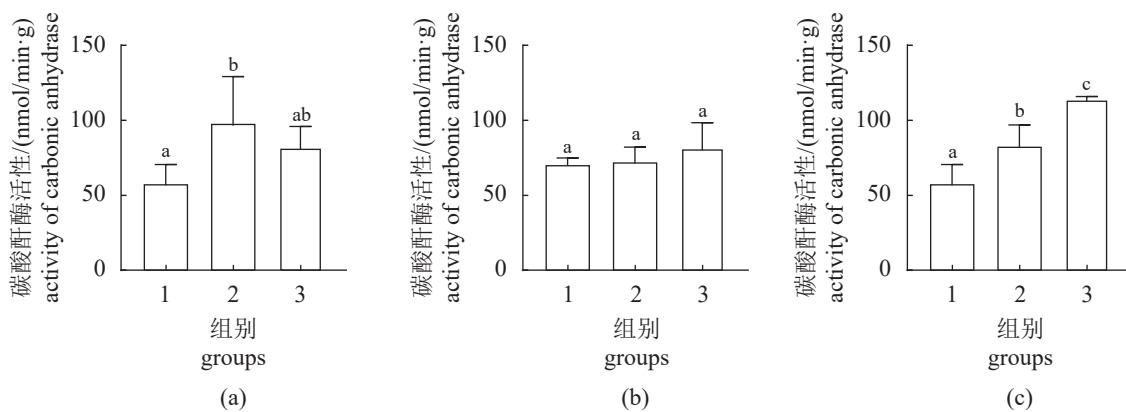


图 3 碳酸盐碱度胁迫对脊尾白虾碳酸酐酶活性的影响

(a) 肌肉, (b) 肝胰腺, (c) 鳃, 图 4 同。

Fig. 3 Effects of carbonate alkalinity stress on carbonic anhydrase activity of *E. carinicauda*

(a) muscle, (b) hepatopancreas, (c) gills, the same as Fig.4.

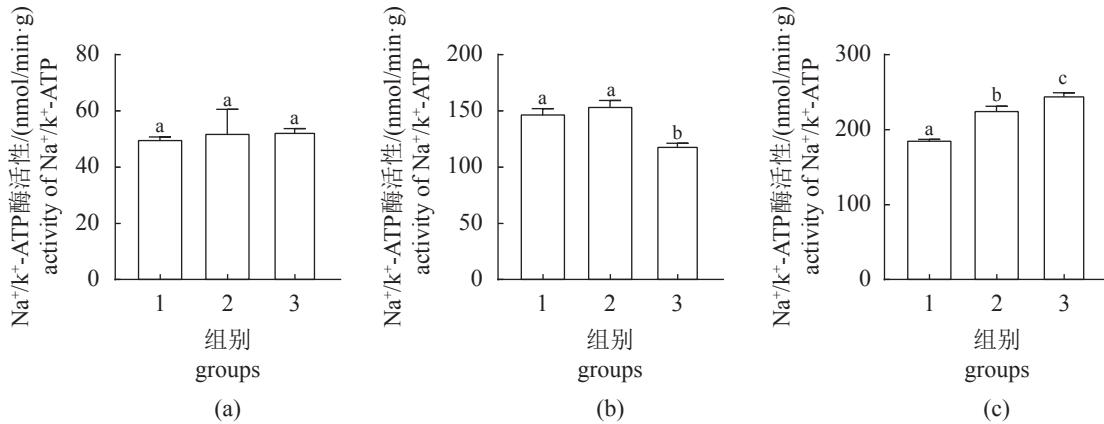
3 讨论

3.1 碳酸盐碱度对脊尾白虾生长性能的影响

增重率、生长率和成活率是衡量水产动物生长和养殖效益的重要指标。研究发现, 碱度胁迫会影响尼罗罗非鱼的生长^[16]。本研究表明, 在碳酸盐碱度胁迫下, 脊尾白虾能够生存, 但其成活率随着碳酸盐碱度的升高而降低, 且在 8 mmol/L 碳酸盐碱度条件下, 其生长速率低于正常组, 而 5 mmol/L 碳酸盐碱度组与正常组无显著差异, 推测高碳酸盐碱度会影响脊尾白虾的生长速率。另一方面, 高碳酸盐碱度和高 pH 是制约盐碱地水产养殖的主要因子之一^[17], 且二者对养殖生物生存与生长的影响具有协同作用^[18]。研究发现当水环境 pH 超过 9.0 且碳酸盐碱度为 3 mmol/L 时, 凡纳滨对虾存活率受到显著影响, 随着碳酸盐碱度的升高, 存活率降低, 且耐受力随着 pH 的升

高逐渐降低^[5]。房文红等^[6]研究发现, 中国明对虾幼虾的成活率随着碱度的升高而降低, 且碳酸盐碱度和 pH 对幼虾的致毒效应表现出协同作用。雷衍之等^[19]也认为高碱度对水生动物产生的致毒效应受到水体的 pH 和盐度等因素的影响。于天基等^[20]研究发现, 当 pH 为 5.2~9.9 时, 脊尾白虾 96 h 几乎没有死亡, 这说明脊尾白虾对低 pH 具有很高的耐受性, 然而随着碳酸盐碱度的升高, 水体中的 OH⁻增多, 导致 pH 升高, 因此在高 pH 条件下脊尾白虾对碳酸盐碱度的耐受性会降低。

鳃作为甲壳动物进行气体交换和离子调节的重要器官, 在发挥生理功能时与外界水环境直接接触。研究显示, 长期的外界环境因子的变化会引起鳃的结构变化, 水体环境对水产动物刺激较大时, 会导致鳃的结构出现器质性损伤^[21-22], 影响甲壳动物的呼吸功能和渗透调节作用。水产动物在对碱度胁迫的适应过程中, 鳃的组织结构也

图 4 碳酸盐碱度对脊尾白虾 Na^+/K^+ -ATP 酶活性的影响Fig. 4 Effects of carbonate alkalinity on Na^+/K^+ -ATPase activity of *E. carinicauda*

发生了不同程度的适应性改变，但当超过机体自身耐受范围，则会发生器质性病变，严重时导致死亡^[23]。武鹏飞^[24]在研究碳酸盐碱度对达里湖高原鳅 (*Triplophysa dalai*) 的鳃组织结构的影响中发现，高碱度会使达里湖高原鳅的鳃丝萎缩、鳃小片弯曲缩短，上皮细胞出现不同程度的水肿，甚至脱落现象。本研究发现，碳酸盐碱度会损伤脊尾白虾的鳃组织结构，脊尾白虾的鳃为叶状鳃，由鳃轴和鳃叶两部分组成^[25]；在 5 mmol/L 碳酸盐碱度胁迫下鳃组织出现轻微肿大、角质层间隙扩张现象，推测脊尾白虾经过一段时间调节后能基本适应此碱度。而当脊尾白虾在 8 mmol/L 碳酸盐碱度胁迫下，由于水体中高浓度的 OH^- 、 HCO_3^- 、 CO_3^{2-} 等复杂离子组成，会直接作用于鳃组织表面，推测各种离子浓度可能超过了脊尾白虾的渗透调节功能，破坏了鳃丝上皮细胞的离子交换体系，使体内酸碱缓冲体系和细胞膜通透性遭到破坏，从而造成脊尾白虾的鳃组织器质性损伤。

肝胰腺是甲壳动物的重要器官，发挥着类似于脊椎动物肝、胰脏和肠道等的功能，其组织结构的变化在一定程度上能反映出机体对环境的适应性改变^[26-27]。研究发现，碳酸盐碱度也会导致脊尾白虾肝胰腺组织损伤。研究表明，环境变化可能会引起甲壳动物肝胰腺中细胞组成比例发生适应性变化，特别是 B 细胞和 R 细胞^[28]。三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 在低盐胁迫 72 h 后出现了 R 细胞减少，B 细胞内转运泡数量增多、体积增大，肝细胞中空泡增多的现象^[29]。中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 在氨氮胁迫后也出现了 B 细胞内空泡增多的现象^[28]。这些与本研究的结果具有一定的相似性。B 细胞不仅有分泌功能，还

具有消化吸收营养物质的作用。甲壳动物在环境胁迫时，会降低自身活动水平并且将储存的营养物质更多地用于维持机体的基本生理代谢^[30]。本研究中，碳酸盐碱度胁迫使脊尾白虾可能需要更多的营养物质来维持基本生理代谢，而 B 细胞及其内部转运泡增多、体积增大，促进了代谢吸收，有助于为其提供更多的能量。

此外，碳酸盐碱度还会影响脊尾白虾体内酶的活性，碳酸酐酶是生物体内广泛存在的含 Zn 金属酶，主要参与 CO_2 的水解过程 ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$)，广泛参与细胞内外 CO_2 、 HCO_3^- 、 H^+ 浓度的调节，与水产动物渗透压调控和酸碱平衡密切相关^[31-32]。潘爱军等^[33]发现，盐度从 5 突变到 25 后，凡纳滨对虾鳃和触角腺碳酸酐酶活性显著升高。本研究中，脊尾白虾鳃组织中的碳酸酐酶活性随水体碳酸盐碱度的升高整体呈上升趋势，其中 5 mmol/L 组的碳酸酐酶活性与 3 mmol/L 组差异不显著，8 mmol/L 组与 5 mmol/L 和 3 mmol/L 组差异均显著，推测在碳酸盐碱度的胁迫下，脊尾白虾通过增强碳酸酐酶的活性来调节体内酸碱平衡与渗透压。渗透调节是广盐类甲壳类动物调节渗透和离子浓度的重要机制， Na^+/K^+ -ATP 酶是渗透压、细胞体积内稳态和维持电化学梯度的关键酶^[34]，它的主要功能是将胞内的 Na^+ 排出，同时向胞内运输 K^+ ，在维持细胞膜内外的电化学梯度中起着核心作用^[35]。甲壳类动物对离子的吸收主要归因于 Na^+/K^+ -ATP 酶的活性^[36]。本研究中，随水体碳酸盐碱度的升高，脊尾白虾鳃组织中的 Na^+/K^+ -ATP 酶活性整体呈上升趋势，其中 5 mmol/L 组和 8 mmol/L 组的 Na^+/K^+ -ATP 酶活性显著高于 3 mmol/L 组，推测在碳酸盐碱度胁迫下，

脊尾白虾可以通过增加 Na^+/K^+ -ATP 酶活性来调节体内渗透压的稳定。

3.2 碳酸盐碱度对脊尾白虾卵巢发育的影响

水生动物的正常生长繁殖需要一定的碳酸盐碱度来保持水体缓冲能力, 在一定范围内调高碱度会提高养殖系统的生产力^[37]。有研究表明, 在碱度为 2.05~4.58 mmol/L 的条件下, 蒙古裸腹溞 (*Moina mongolica*) 生长发育和生殖的各项指标最佳; 碱度为 6.43~8.98 mmol/L 时, 各项指标都有递降的趋势^[38]。徐伟等^[11]在大鱗鯻对盐碱的耐受性实验中显示, 在盐度 3.2、碱度 14.32 mmol/L 以下的水体中, 胚胎 72 h 成活率不受影响; 在盐度 5.1、碱度 14.32 mmol/L 以下的水体, 仔鱼 96 h 成活率不受影响。本研究结果显示, 三组碳酸盐碱度胁迫下脊尾白虾卵巢均能发育, 其中 5 mmol/L 与对照组间无显著差异, 8 mmol/L 组显著低于对照组, 推测在 8 mmol/L 的碳酸盐碱度环境中, 脊尾白虾可以生长繁殖, 但是其卵巢的发育速率受到了影响。甲壳类动物卵子的发生与滤泡细胞关系密切, 滤泡细胞伴随卵母细胞生长的整个过程, 随卵母细胞发育程度的不同而相应变化, 国内外学者普遍认为滤泡细胞对卵母细胞外源性卵黄物质的积累起着重要作用^[39]。通过脊尾白虾卵巢组织学切片发现, 5 mmol/L 和对照组卵巢发育几乎同步, 卵巢中主要是卵原细胞和单层滤泡细胞, 当碳酸盐碱度增加到 8 mmol/L 时, 卵巢腔内卵原细胞排列疏松, 且周围滤泡细胞数量较少, 推测在高碳酸盐碱度的影响下, 卵母细胞外源性卵黄物质的积累速率减缓, 从而影响卵巢的发育速率。综上, 脊尾白虾可以在低于 8 mmol/L 的碳酸盐碱度中生长发育, 但其生长速率以及卵巢发育速率仍会受到高碳酸盐碱度的影响。

4 结论

本研究通过不同碳酸盐碱度胁迫脊尾白虾, 初步探讨脊尾白虾在长期碳酸盐碱度胁迫下的生长及卵巢发育的情况, 研究结果发现, 低碳酸盐碱度对脊尾白虾体长增长率、体重增长率以及成活率无显著影响, 但高碳酸盐碱度会造成脊尾白虾鳃和肝胰腺组织损伤, 导致其体长增长率、体重增长率以及成活率受到影响。通过对脊尾白虾卵巢组织切片观察发现, 当碳酸盐碱度增加到 8 mmol/L 时, 卵巢腔内卵原细胞排列疏松且周围滤

泡细胞数量较少, 推测在高碳酸盐碱度的影响下, 卵母细胞外源性卵黄物质的积累速率减缓, 从而影响卵巢的发育速率。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Sharma B R, Minhas P S. Strategies for managing saline/alkali waters for sustainable agricultural production in South Asia[J]. *Agricultural Water Management*, 2005, 78(1-2): 136-151.
- [2] Fan Z, Wu D, Zhang Y Y, et al. Carbonate alkalinity and dietary protein levels affected growth performance, intestinal immune responses and intestinal microflora in Songpu mirror carp (*Cyprinus Carpio Songpu*)[J]. *Aquaculture*, 2021, 545: 737135.
- [3] Wang Y C, Yang C P, Liu G F, et al. Development of a cDNA microarray to identify gene expression of *Puccinellia tenuiflora* under saline-alkali stress[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2007, 45(8): 567-576.
- [4] 杨富亿, 李秀军, 田明增, 等. 盐碱水域对虾体质量生长与环境因子的相关性[J]. 水产科学, 2008, 27(9): 438-442.
Yang F Y, Li X J, Tian M Z, et al. Relationship between growth of white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* in body mass and environmental factors in carbonate saline-alkali waters[J]. *Fisheries Science*, 2008, 27(9): 438-442 (in Chinese).
- [5] Yao Z L, Lai Q F, Zhou K, et al. Developmental biology of medaka fish (*Oryzias latipes*) exposed to alkalinity stress[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2010, 26(3): 397-402.
- [6] 房文红, 王慧, 来琦芳. 碳酸盐碱度、pH对中国对虾幼虾的致毒效应[J]. 中国水产科学, 2000, 7(4): 78-81.
Fang W H, Wang H, Lai Q F. Toxicity of carbonate-alkalinity and pH to larval *Penaeus chinensis*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2000, 7(4): 78-81 (in Chinese).
- [7] 尤琦, 尤洋, 胡庚东. 运用正交设计法检验盐度和碱度对大银鱼的联合毒性[J]. 西南民族学院学报·自然科学版, 2000, 26(2): 192-194.
You Q, You Y, Hu G D. Test on joint toxicity of salinity and alkalinity by orthogonal design[J]. *Journal of Southwest Nationalities College (Natural Science Edition)*, 2000, 26(2): 192-194 (in Chinese).
- [8] Lin T T, Lai Q F, Yao Z L, et al. Combined effects of carbonate alkalinity and pH on survival, growth and

- haemocyte parameters of the Venus clam *Cyclina sinensis*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(2): 525-531.
- [9] 常玉梅, 何强, 孙言春, 等. 碳酸盐碱度胁迫下瓦氏雅罗鱼血浆游离氨基酸水平的变化[J]. 中国水产科学, 2016, 23(1): 117-124.
- Chang Y M, He Q, Sun Y C, et al. Changes in plasma free amino acid levels in *Leuciscus waleckii* exposed to different environmental alkalinity levels[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(1): 117-124 (in Chinese).
- [10] 刘济源, 么宗利, 来琦芳, 等. 盐碱胁迫对青海湖裸鲤耗氧率、血浆渗透浓度和离子浓度的影响[J]. 生态学杂志, 2012, 31(3): 664-669.
- Liu J Y, Yao Z L, Lai Q F, et al. Effects of saline-alkali stress on the oxygen consumption and plasma osmolality and ion concentrations of *Gymnocypris przewalskii* [J]. Chinese Journal of Ecology, 2012, 31(3): 664-669 (in Chinese).
- [11] 徐伟, 耿龙武, 李池陶, 等. 大鳞鲃的人工繁殖、胚胎发育和耐盐碱测定[J]. 水产学报, 2011, 35(2): 255-260.
- Xu W, Geng L W, Li C T, et al. The artificial propagation, embryonic development and saline-alkali tolerant experiment of *Barbus capito*[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(2): 255-260 (in Chinese).
- [12] 赵丽慧. 盐碱度对尼罗罗非鱼生长、渗透生理及鳃离子转运酶基因表达的影响 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2014.
- Zhao L H. Effects of salinity-alkalinity on growth, osmophysiology and relative expression of gill ion transport enzymes of *Oreochromis niloticus*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014 (in Chinese).
- [13] 杨富亿, 李秀军, 杨欣乔, 等. 凡纳滨对虾对东北碳酸盐型盐碱水域的适应能力[J]. 海洋科学, 2008, 32(1): 41-44.
- Yang F Y, Li X J, Yang X Q, et al. Adaptability of *Litopenaeus vannamei* to carbonate saline-alkaline waters in northeast China[J]. Marine Sciences, 2008, 32(1): 41-44 (in Chinese).
- [14] 柳飞, 李健, 李吉涛, 等. 碳酸盐碱度对脊尾白虾生存、生长、繁殖及免疫酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 2016, 23(5): 1137-1147.
- Liu F, Li J, Li J T, et al. Effects of carbonate alkalinity stress on the survival, growth, reproduction, and immune enzyme activities of *Exopalaemon carinicauda*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(5): 1137-1147 (in Chinese).
- [15] Chang Z Q, Neori A, He Y Y, et al. Development and current state of seawater shrimp farming, with an emphasis on integrated multi - trophic pond aquaculture farms, in China – a review[J]. Reviews in Aquaculture, 2020, 4(12): 2544-2558.
- [16] 赵丽慧, 赵金良, Jeerawat T, 等. 盐碱胁迫对尼罗罗非鱼血清渗透压、离子浓度及离子转运酶基因表达的影响[J]. 水产学报, 2014, 38(10): 1696-1704.
- Zhao L H, Zhao J L, Jeerawat T, et al. Effects of salinity-alkalinity on serum osmolality, ion concentration and mRNA expression of ion transport enzymes of *Oreochromis niloticus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(10): 1696-1704 (in Chinese).
- [17] 王慧, 耿隆坤, 房文红, 等. 中国对虾往西北内陆咸水水域移植的生产性试养研究[J]. 海洋渔业, 1997(1): 9-12.
- Wang H, Geng L K, Fang W H, et al. Study on the commercially experimental culture of penaeid shrimp, *Penaeus chinensis*, transplanted to the northwest inland salt waters[J]. Marine Fisheries, 1997(1): 9-12 (in Chinese).
- [18] 潘鲁青, 刘志, 姜令绪. 盐度、pH变化对凡纳滨对虾鳃丝Na⁺-K⁺-ATPase活力的影响[J]. 中国海洋大学学报, 2004, 34(5): 787-790.
- Pan L Q, Liu Z, Jiang L X. The effect of salinity and pH changes on gill Na⁺-K⁺-ATPase activity of *Litopenaeus vannamei*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2004, 34(5): 787-790 (in Chinese).
- [19] 雷衍之, 董双林, 沈成钢. 碳酸盐碱度对鱼类毒性作用的研究[J]. 水产学报, 1985, 9(2): 171-183.
- Lei Y Z, Dong S L, Shen C G. Study on the toxicity of carbonate-alkaline to fishes[J]. Journal of Fisheries of China, 1985, 9(2): 171-183 (in Chinese).
- [20] 于天基, 李健, 李吉涛, 等. pH胁迫对脊尾白虾抗氧化酶活力的影响[J]. 海洋科学, 2015, 39(5): 47-53.
- Yu T J, Li J, Li J T, et al. The effects of pH changes on antioxidant enzyme activities of ridgetail white prawn (*Palaemon carinicauda*)[J]. Marine Sciences, 2015, 39(5): 47-53 (in Chinese).
- [21] Cengiz E I, Unlu E. Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: a microscopic study[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2006, 21(3): 246-253.
- [22] Yancheva V, Mollov I, Velcheva I, et al. Cadmium (Cd) affects the gill structure and respiration rate of common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. ZooNotes, 2016, 97: 1-4.
- [23] 陶易凡, 强俊, 王辉, 等. 低pH胁迫对克氏原螯虾鳃和肝胰腺酶活力及组织结构的影响[J]. 中国水产科学,

- 2016, 23(6): 1279-1289.
- Tao Y F, Qiang J, Wang H, et al. Acute toxicity of low-pH stress and its effect on enzyme activity and histological structure of gill and hepatopancreas in *Procambarus clarkii*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(6): 1279-1289 (in Chinese).
- [24] 武鹏飞. 达里湖高原鳅盐碱适应性研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.
- Wu P F. The Research of adaptability in salinity and alkalinity of *Triphlophysa dalai*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017 (in Chinese).
- [25] Freire C A, Onken H, McNamara J C. A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2008, 151(3): 272-304.
- [26] Caceci T, Neck K F, Lewis D D H, et al. Ultrastructure of the hepatopancreas of the pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda)[J]. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 1988, 68(2): 323-337.
- [27] Papathanassiou E, King P E. Effects of starvation on the fine structure of the hepatopancreas in the common prawn *Palaemon serratus* (pennant)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Physiology, 1984, 77(2): 243-249.
- [28] 洪美玲, 陈立侨, 顾顺樟, 等. 氨氮胁迫对中华绒螯蟹免疫指标及肝胰腺组织结构的影响[J]. 中国水产科学, 2007, 14(3): 412-418.
- Hong M L, Chen L Q, Gu S Z, et al. Effects of ammonia exposure on immunity indicators of haemolymph and histological structure of hepatopancreas in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(3): 412-418 (in Chinese).
- [29] 韩晓琳, 高保全, 王好锋, 等. 低盐胁迫对三疣梭子蟹鳃和肝胰腺显微结构及家系存活的影响[J]. 渔业科学进展, 2014, 35(1): 104-110.
- Han X L, Gao B Q, Wang H F, et al. Effects of low salinity stress on microstructure of gill and hepatopancreas and family survival rate of *Portunus trituberculatus*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2014, 35(1): 104-110 (in Chinese).
- [30] 于赫男. 环境胁迫对罗氏沼虾和凡纳滨对虾行为、生长及生理活动的影响 [D]. 广州: 暨南大学, 2007.
- Yu H N. Effects of environmental stress on behavior, growth and physiological activity of *Macrobrachium rosenbergii* and *Litopenaeus vannamei*[D]. Guangzhou: Jinan University, 2007 (in Chinese).
- [31] Geers C, Gros G. Carbon dioxide transport and carbonic anhydrase in blood and muscle[J]. Physiological Reviews, 2000, 80(2): 681-715.
- [32] Breton S. The cellular physiology of carbonic anhydrases[J]. JOP: Journal of the Pancreas, 2001, 2(4 Suppl): 159-164.
- [33] 潘爱军, 来琦芳, 王慧, 等. 盐度突变对凡纳滨对虾组织碳酸酐酶活性的影响[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(1): 47-51.
- Pan A J, Lai Q F, Wang H, et al. Effects of abrupt salinity changes on the carbonic anhydrase activity in the tissues of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2006, 15(1): 47-51 (in Chinese).
- [34] Sáez A G, Lozano E, Zaldívar-Riverón A. Evolutionary history of Na⁺/K⁺-ATPases and their osmoregulatory role[J]. Genetica, 2009, 136(3): 479-490.
- [35] Li J T, Ma P, Liu P, et al. The roles of Na⁺/K⁺-ATPase α-subunit gene from the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda* in response to salinity stresses[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 42(2): 264-271.
- [36] Lucu Č, Towle D W. Na⁺/K⁺-ATPase in gills of aquatic crustacea[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A:Molecular & Integrative Physiology, 2003, 135(2): 195-214.
- [37] Ballester E L C, Abreu P C, Cavalli R O, et al. Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeus paulensis* Juveniles nursed in a zero exchange suspended microbial flocs intensive system[J]. Aquaculture Nutrition, 2010, 16(2): 163-172.
- [38] 赵文, 王超, 张路, 等. 碱度和pH对两品系蒙古裸腹溞(*Moina mongolica Daday*)存活、生长和生殖的影响[J]. 生态学报, 2009, 29(2): 589-598.
- Zhao W, Wang C, Zhang L, et al. Effects of alkalinity and pH on the survival, growth and neonate production of two strains of *Moina mongolica Daday*[J]. Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(2): 589-598 (in Chinese).
- [39] 栗治国, 张成松, 李富花, 等. 脊尾白虾的性腺发育及组织结构观察[J]. 水产学报, 2014, 38(3): 362-370.
- Li Z G, Zhang C S, Li F H, et al. Histological study on the gonadal development of *Exopalaemon carinicauda* (Holthuis, 1950)[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(3): 362-370 (in Chinese).

Effects of long-term saline-alkaline stress on growth and ovary development of *Exopalaemon carinicauda*

ZHANG Xiuhong^{1,2}, LI Jitao^{2*}, WANG Jiajia², WANG Chengwei², QIN Zhen², GE Qianqian², LIU Ping², LI Jian²

(1. National Experimental Teaching Demonstration Center of Aquatic Science,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods,
Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes,
Qingdao Marine Science and Technology Center,

Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: In order to investigate the effects of carbonate alkalinity (CA) on the growth and ovary development of the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*, three CA gradients of 3 mmol/L (control group), 5 mmol/L and 8 mmol/L were set to culture *E. carinicauda* for 60 days, and the effects of different CA stress on the growth performance, tissue structure, enzyme activity and ovary development were compared. The results showed that there was no significant difference in growth gain, weight gain or survival rate between 5 mmol/L and control groups ($P>0.05$), while those of 8 mmol/L group was significantly lower than control group ($P<0.05$). Hepatopancreas sections showed that the morphological structure of the lumen was severely deformed in 8 mmol/L group. Gill sections showed that gill filaments were swollen, blood cells swelled, epithelial cells were seriously damaged, and the stratum corneum space was deformed in 8 mmol/L group. Carbonic anhydrase activity in 5 mmol/L group was significantly higher than control group ($P<0.05$), while Na^+/K^+ -ATPase activity in muscle showed no significant difference ($P>0.05$); there was no significant difference in carbonic anhydrase in hepatopancreas ($P>0.05$), and Na^+/K^+ -ATPase activity in hepatopancreas of 8 mmol/l group was significantly lower than other groups ($P<0.05$). Na^+/K^+ -ATPase activity in gill of two stress groups was significantly higher than control group ($P<0.05$). Ovaries of all three groups were able to develop, while only 3 mmol/l and 5 mmol/L groups had *E. carinicauda* ovary developed to stage III; ovary sections showed that the arrangement of oocytes in 8 mmol/L group was loose, and the arrangement of surrounding follicular cells was loose and the number was small. To sum up, *E. carinicauda* can grow and develop in CA less than 8 mmol/L, but high CA may cause damage to the gills and hepatopancreas, thus affecting growth. At the same time, it is speculated that high CA may also affect the development rate of ovaries. This study provides basic data and reference information for the enhancement and cultivation of white shrimps in saline-alkaline water.

Key words: *Exopalaemon carinicauda*; carbonate alkalinity stress; growth; tissue sections; enzyme activity; ovary development

Corresponding author: LI Jitao. E-mail: lijt@ysfri.ac.cn

Funding projects: National Key R & D Program of China (2018YFD0901302); National Natural Science Foundation of China (32072974); China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-48); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2023TD50)