

文章编号:1001-5132 (2009) 04-0484-06

pH 突变对拟穴青蟹免疫因子的胁迫影响

刘璐¹, 杨玉娇¹, 王国良^{1,2*}

(1.宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211; 2.宁波大学 医学院, 浙江 宁波 315211)

摘要:以拟穴青蟹为材料,在实验室条件下测定了 pH 6.5、pH 7.0、pH 7.5、pH 8.0、pH 8.5 各梯度胁迫 0 h、24 h、48 h、72 h、96 h 时青蟹的血细胞总数(THC)、血细胞吞噬能力及血清中溶菌酶(LZM)、超氧化物歧化酶(SOD)、碱性磷酸酶(AKP)、酸性磷酸酶(ACP)、过氧化物酶(POD)、酚氧化酶(PO)及溶血素等相关免疫因子的活力变化。结果表明:长时间胁迫使各免疫指标值下降,显示可抑制免疫因子的活性,其中 THC、LZM 和溶血素活力下降明显。小幅度(pH 7.05、pH 8.02)突变下短时间内各项指标值有所上升,而后下降;大幅度(pH 6.45、pH 8.44)突变各项指标值显著降低。pH 胁迫 24 h 后对照组的 THC 显著高于其他各组;pH 7.05、pH 6.45、pH 8.02 组的溶血素活力显著低于对照组;pH 8.44、pH 6.45 组的血细胞吞噬作用和 ACP 活力显著低于对照组。可见 THC、溶血素、血细胞吞噬能力、PO 和 POD 可作为 pH 胁迫对拟穴青蟹抗病力影响的重要参考依据。

关键词:拟穴青蟹; pH 突变; 免疫因子; 胁迫

中图分类号: S968.25

文献标识码: A

拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*),简称青蟹,是浙江沿海地区重要的经济蟹类养殖品种。然而,病害或不明原因的死亡严重制约了青蟹养殖持续健康发展。众所周知,水产生物养殖更直接依赖于水体环境的稳定和优化,病害及死亡的发生通常最先由环境因子变化所诱导^[1],从而引起养殖生物应激反应使其免疫抗病能力下降。

pH 是易于变化的一种海水生态环境因子,对水质和生物有多方面的影响。极端的 pH 环境可以造成水生生物血液酸碱平衡紊乱,使血液离子调节机制、气体交换和血氧输送等功能丧失,甚至危及生物体生存。pH 作为影响虾蟹及贝类存活、生长和免疫活性的重要环境因子正日益受到研究者的

重视^[2-4]。曾缓缓等^[5]研究表明 pH 胁迫对青蟹溶菌酶、酚氧化酶、超氧化物歧化酶的活力有影响。笔者以青蟹血清中的相关免疫因子为指标,研究了 pH 突变和时间效应对养殖青蟹免疫水平及其调节能力的影响,以期青蟹养殖提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

拟穴青蟹购于浙江省三门县红旗养殖场,选取平均体重为(250±16)g 的健康青蟹置于海水中暂养,控制水温 26~28℃,盐度 17.5±1, pH 7.5±0.05,氨氮浓度小于 0.1 mg·L⁻¹,溶解氧大于 5 mg·L⁻¹,每日

收稿日期: 2009-05-16.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://3xb.nbu.edu.cn>

基金项目: 长江学者和创新团队发展计划(IRT0734); 浙江省科技厅重大攻关项目(2005C12038); 浙江省自然科学基金(Y305189).

第一作者: 刘璐(1984-),女,浙江慈溪人,在读硕士研究生,主要研究方向: 水产动物病害. E-mail: liulu-isa@163.com

*通讯作者: 王国良(1955-),男,浙江定海人,教授,主要研究方向: 水产动物病害. E-mail: wanggl@nbip.net

及时吸去排泄物,换水50%,暂养5d后进行实验。

1.2 实验方法

设置pH梯度为6.5,7.0,7.5,8.0,8.5,用NaOH和HCl调节至相应pH水平。每天更换水体的50%。实际测定各组pH值分别为 6.45 ± 0.05 , 7.05 ± 0.06 , 7.50 ± 0.05 , 8.02 ± 0.04 , 8.44 ± 0.04 。pH7.5组放置青蟹18只,其他各组15只。在0h,12h,24h,48h,72h,96h时取样,每组取样3只测定各项指标。

1.3 检测分析方法

1.3.1 血清溶血素的测定

溶血素测定:参照牟海津等^[6]方法。溶血活性单位定义为:试验条件下 OD_{540} 增加0.001为1个溶血活性单位(U)。

1.3.2 血细胞密度

参照叶燕玲等^[7]方法,血清与固定液1:1混合,用血球计数板计数。

1.3.3 血细胞吞噬能力测定

显微镜检测法:参考陈孝焯等^[8]方法,并做适当调整。将0.5mL浓度为 1×10^7 细胞 \cdot mL⁻¹血细胞悬液与0.5mL浓度为 $1\times 10^6\sim 1\times 10^7$ cfu \cdot mL⁻¹大肠杆菌悬液混合,28℃保温1h。加入等量预冷生理盐水,离心弃上清液。沉淀用生理盐水洗涤2次。将处理后的沉淀悬浮于生理盐水,置4℃冰箱备检。

样品用甲醇固定,Giemsa染色,油镜下观察计数。数据处理采用 t 测验。

1.3.4 血清酶活力测定

血清溶菌酶(LZM)、超氧化物歧化酶(SOD)、酸性磷酸酶(ACP)与碱性磷酸酶(AKP)活力采用南京建成生物工程研究所的酶活力测定试剂盒测定。

血清酚氧化酶活力(PO)以L-DOPA(Sigma)为底物,参考Smith等^[9]方法测定。PO活力定义为试验条件下 OD_{490} 增加0.001为1个活性单位。

血清过氧化物酶活力(POD)以3,3-二氨基联苯胺四盐酸盐(DAB-4HCl)为底物,按参考文献^[10]方法测定。POD活力定义为试验条件下 OD_{470} 增加0.001为1个活性单位。

为方便起见,试验采用控制相同测定条件的方法,直接用活性单位表示酶活力。

1.4 统计分析

用统计软件SPSS 13.0对各实验组分别进行多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 pH突变对青蟹血细胞密度的影响

不同pH条件下青蟹的血细胞密度(THC)见图1。12h各实验组THC达到最高值,而后下降,48~96h趋于平稳。在12h,24h,48h,各实验组的THC均极显著低于对照组(pH7.50组)($p < 0.01$)。说明在短时间内THC即可因pH突变而下降,其中pH降低影响显著。pH影响72h和96h,各实验组的THC仍极显著低于对照组($p < 0.01$)。说明在长时间pH胁迫下,青蟹THC受持续影响而难以恢复。

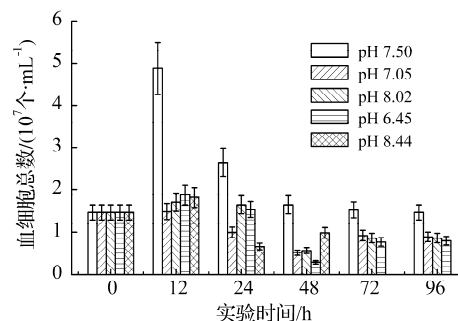


图1 pH突变对青蟹血细胞数的影响

2.2 pH突变对青蟹血细胞吞噬作用的影响

不同pH条件下青蟹的血细胞吞噬百分比和血细胞吞噬指数见图2和图3。pH从7.50突变至7.05和8.02,青蟹的吞噬百分数(PP)和吞噬指数(PI)均没有显著的影响。而pH6.45组的PP在12h已显著高于对照组($p < 0.05$),pH8.44组12h也达到最高值;24h开始pH8.44组极显著低于对照组($p < 0.01$),72h开始pH6.45组显著低于对照组($p < 0.05$)。青蟹血细胞的PI自胁迫12h开始,pH6.45组和pH8.44组已显著低于对照组($p < 0.05$),48h后极显著低于对照组($p < 0.01$),说明小幅度的pH

变化对青蟹血细胞吞噬作用没有明显影响,而大幅度的pH变化短时间可以提高PP,但长时间会显著抑制血细胞的吞噬作用。

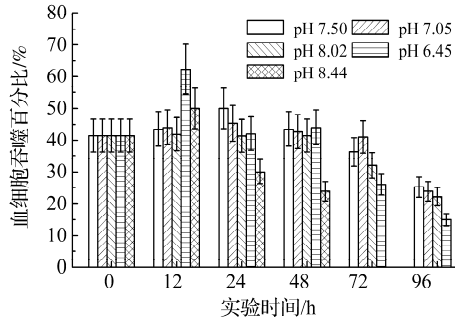


图2 pH突变对青蟹血细胞吞噬百分比的影响

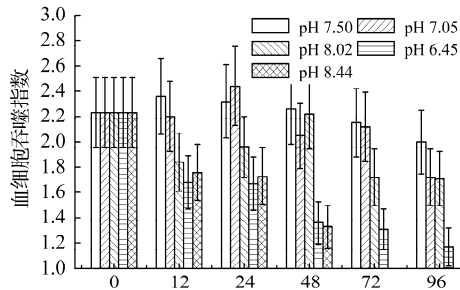


图3 pH突变对青蟹血细胞吞噬指数的影响

2.3 pH突变对青蟹血清溶菌酶活力的影响

不同pH条件下青蟹血清溶菌酶活力见图4。在12h和24h各实验组的LZM活力与对照组没有明显差异。在48h pH 7.05组和pH 8.02组的LZM活力显著高于对照组($p < 0.05$),而pH 6.45组和pH 8.44组的LZM活力则极显著低于对照组($p < 0.01$),说明在相对较短时间内,小幅度pH变化能使LZM活力升高;而大幅度pH变化则明显抑制LZM活力。在72h和96h各实验组的LZM活力均极显著低于对照组($p < 0.01$),且极显著低于初始值($p < 0.01$)。说明在长时间pH胁迫下,即使小幅度的pH变化也能使青蟹的LZM活力明显下降。

2.4 pH突变对青蟹血清碱性磷酸酶活力的影响

不同pH条件下青蟹血清碱性磷酸酶活力见图5。在12h, pH 7.05组和pH 6.45组的AKP活力极显著地高于对照组,说明在短时间内,偏酸性的pH胁迫可以刺激机体AKP活力上升。48h时pH 8.44组的AKP活力极显著低于对照组($p < 0.01$),

说明在相对较长的时间里,大幅度向碱性变化的pH能明显降低青蟹AKP活力。

2.5 pH突变对青蟹血清酸性磷酸酶活力的影响

不同pH条件下青蟹血清酸性磷酸酶活力见图6。在12h, pH 8.44组和pH 6.45组的ACP活力极显著地高于对照组($p < 0.01$),而pH 8.02组和pH 7.05组与对照组没有显著差别。说明在短时间内,大幅度的pH变化会刺激机体的ACP活力显著上升,而小幅度pH变化对青蟹ACP活力没有明显影响。在24h和48h, pH 8.44组和pH 6.45组的ACP活力极显著地低于对照组($p < 0.01$)。说明长时间,大幅度变化的pH可使机体的ACP活力大大下降。

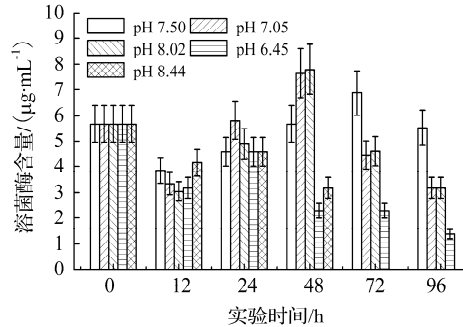


图4 pH突变对青蟹血清溶菌酶活力的影响

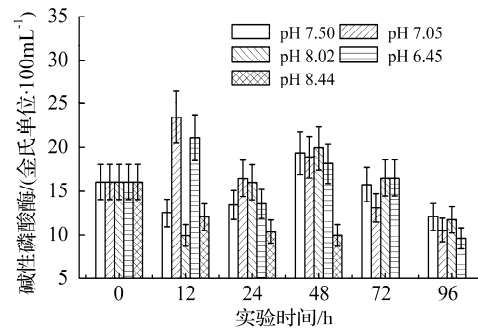


图5 pH突变对青蟹血清碱性磷酸酶活力的影响

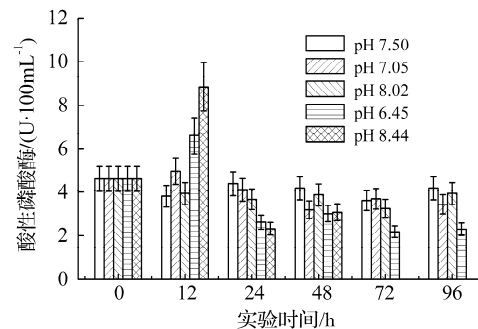


图6 pH突变对青蟹血清酸性磷酸酶活力的影响

2.6 pH 突变对青蟹血清超氧化物歧化酶活力的影响

不同 pH 条件下青蟹血清超氧化物歧化酶活力见图 7. pH 7.05 组青蟹 SOD 活力在短时间内与对照组没有明显的差异, 随后呈下降趋势, 在 96 h 显著低于对照组($p < 0.05$). pH 6.45 组的 SOD 在 96 h 极显著低于对照组($p < 0.01$), 说明短时间内偏酸性的 pH 突变对青蟹血清 SOD 活力影响不大, 但长时间胁迫可明显降低青蟹 SOD 活力. pH 8.02 组的 SOD 活力在 12 h 显著高于对照组($p < 0.05$). pH 8.44 组在 48 h 显著低于对照组($p < 0.05$). 说明小幅度偏碱性 pH 突变短期内会刺激 SOD 活力上升, 而大幅度偏碱性 pH 突变会显著降低 SOD 活力.

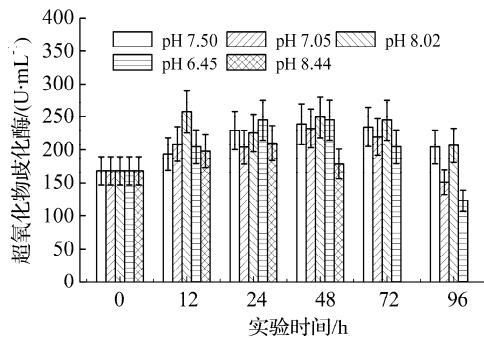


图 7 pH 突变对青蟹血清超氧化物歧化酶活力的影响

2.7 pH 突变对青蟹血清酚氧化酶活力的影响

不同 pH 条件下青蟹血清酚氧化酶活力见图 8. pH 7.05 组的血清 PO 活力在 72 h 达最大值, 且显著高于对照组($p < 0.05$). pH 8.02 组在 24 h 达最大值, 且极显著高于对照组($p < 0.01$), 96 h 显著低于对照组($p < 0.05$). pH 6.45 组变化趋势与 pH 8.02 组相同, 且变化幅度较 pH 8.02 组大. pH 8.44 组的 PO 活力低于对照组并呈下降趋势, 48 h 时显著低于对

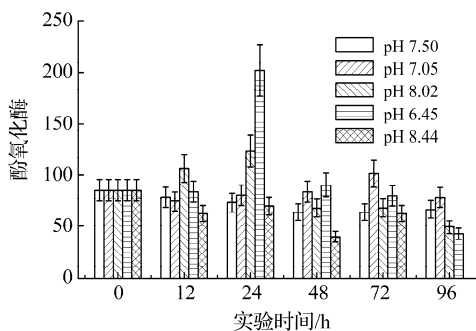


图 8 pH 突变对青蟹血清酚氧化酶活力的影响

对照组($p < 0.05$), 说明 pH 突变在短期内会刺激机体的 PO 活力显著上升, 长时间胁迫会抑制 PO 活力, 而大幅度偏碱性 pH 突变会显著降低 PO 活力.

2.8 pH 突变对青蟹血清过氧化物酶活力的影响

不同 pH 条件下青蟹血清过氧化物酶活力见图 9. 各实验组在试验时间内的青蟹血清 POD 活力变化及影响与青蟹血清酚氧化酶活力影响实验的结果基本相似.

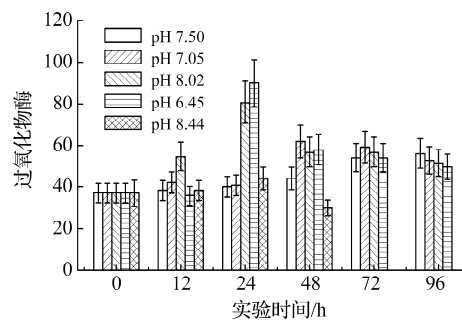


图 9 pH 突变对青蟹血清过氧化物酶活力的影响

2.9 pH 突变对青蟹血清溶血素活力的影响

不同 pH 条件下青蟹血清溶血素活力见图 10. pH 7.05 组和 pH 8.02 组的溶血素活力在 24 h 开始显著低于对照组($p < 0.05$), 48 h 以后极显著低于对照组($p < 0.01$). pH 6.45 组和 pH 8.44 组的溶血素活力 12 h 时已显著低于对照组($p < 0.05$), 24 h 后极显著低于对照组($p < 0.01$), 说明 pH 突变能显著影响青蟹的溶血素, 且大幅度, 短时间下的影响显著.

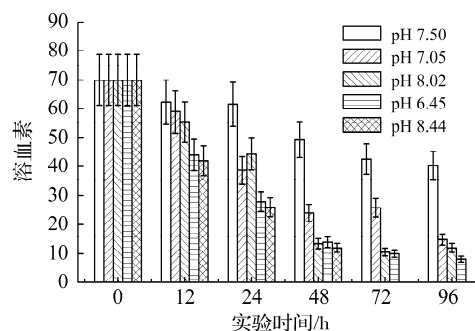


图 10 pH 突变对青蟹血清溶血素活力的影响

3 讨论

3.1 pH 值对于养殖虾蟹存活率的影响

据报道^[11], 中国对虾生活在 pH 为 7.6~9.0 的海

表1 pH胁迫青蟹24h各相关免疫指标值

免疫指标	pH 7.50	pH 7.05	pH 8.02	pH 6.45	pH 8.44
THC/($10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$)	2.65 ± 0.33	0.99 ± 0.12	1.64 ± 0.21	1.53 ± 0.19	0.66 ± 0.08
PP/%	50.00 ± 6.25	45.33 ± 5.67	41.33 ± 5.17	42.00 ± 5.25	30.00 ± 3.74
PI	2.32 ± 0.29	2.44 ± 0.31	1.96 ± 0.24	1.67 ± 0.21	1.73 ± 0.22
LZM/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	4.58 ± 0.57	5.80 ± 0.72	4.88 ± 0.61	4.58 ± 0.57	4.58 ± 0.57
AKP/(金氏单位 $\cdot 100\text{mL}^{-1}$)	13.41 ± 1.68	16.47 ± 2.06	16.02 ± 2.00	13.53 ± 1.69	10.38 ± 1.30
ACP/($\text{U} \cdot 100\text{mL}^{-1}$)	4.39 ± 0.55	4.11 ± 0.51	3.68 ± 0.46	2.63 ± 0.33	2.32 ± 0.29
SOD/($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	228.87 ± 28.61	203.84 ± 25.48	225.15 ± 28.14	244.60 ± 30.58	209.84 ± 26.23
PO	73.33 ± 9.17	80.67 ± 10.08	123.33 ± 15.42	202.00 ± 25.25	70.00 ± 8.75
POD	40.00 ± 4.99	40.67 ± 5.08	80.67 ± 10.08	90.00 ± 11.25	44.00 ± 5.49
溶血素	61.53 ± 7.69	38.67 ± 4.83	44.33 ± 5.54	28.00 ± 3.50	26.00 ± 3.26

水中最适宜, pH 低于 4.8 或高于 10.6 对于中国对虾是致命的. Chen 等^[12]研究发现, 在 pH 为 7.0~8.5 的范围内, 中国对虾幼虾的耗氧率随 pH 的下降而升高. 曾缓缓等^[5]认为拟穴青蟹适宜在 pH 7.5~9.0 的环境下生活, 过酸或过碱的养殖环境均会导致其免疫力降低. 以上的研究均表明 pH 变化可以显著影响甲壳类的生存和代谢.

3.2 pH 突变对拟穴青蟹血清免疫水平的影响

拟穴青蟹对 pH 的适应范围是 6.5~8.9, 以 7.8~8.4 为宜^[13]. 我们实验的 pH 突变范围未超出青蟹的调节能力, 实验结果表明 pH 突变对养殖青蟹免疫力的影响是显著的. pH 突变会使青蟹的 THC 和 LZM 活力明显下降, 这是由于环境突变使青蟹在短时间内进行血液渗透调节, 引发部分血细胞自溶. 其他各项免疫指标均在 12 h 到 24 h 出现一个峰值, 而后趋于平稳, 并且各项指标变化的时间、幅度均与 pH 突变幅度相关. 一般小幅度的 pH 突变在短时间内使各指标值上升, 而后下降趋于稳定; 而大幅度突变则显著降低各项指标值, 并影响青蟹自身的免疫调节能力, 使得免疫水平低下, 难以恢复. 时间效应上, pH 胁迫 24 h 对青蟹血清免疫因子产生明显影响, 表明青蟹已进行被动性的免疫调节, 认为拟穴青蟹在 pH 胁迫 24 h 易发生应激反应, 此时的指标值可作为 pH 胁迫预警的参考值.

3.3 pH 胁迫影响可反映拟穴青蟹的抗病力指标

抗病力指标应选取能早期明显反映免疫水平

变化的因子. 由 pH 胁迫青蟹 24 h 各相关免疫指标值(表 1)可见, THC、溶血素、PO 和 POD 等免疫因子均适合作为反映 pH 对青蟹胁迫的抗病力指标.

影响 pH 变化的因素较多, 主要有台风降雨、淡水输入、工业污染、酸雨和浮游植物代谢等. 青蟹如长期在 pH 突变的环境中生活, 应激反应加强, 其免疫抗病能力会逐渐下降, 对病原体易感性提高, 疾病也易发生. 因此, 当养殖塘中的 pH 发生突变时, 应尽快调节水质, 预防青蟹疾病的发生.

参考文献:

- [1] 乔振国, 张虎, 归从时, 等. 环境因子变化对锯缘青蟹后期幼体及仔蟹变态存活率的影响[J]. 海洋渔业, 2004, 26(1):40-43.
- [2] Le Moullac G, Haffner P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea[J]. Aquaculture, 2000, 191:121-131.
- [3] Cheng Winton, Chen Jiannchu. Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2002, 10:387-391.
- [4] 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.
- [5] 曾缓缓, 艾春香, 刘建国, 等. pH 胁迫对拟穴青蟹体内几种免疫因子的影响[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2008, 47(3):413-418.
- [6] 牟海津, 江晓路, 刘树青, 等. 日本对虾溶血素的活性测定及性能研究[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(4):362-367.

- [7] 叶燕玲, 陈宽智. 中国对虾(*Penaeus chinensis*)血细胞超微结构、分类及计数[J]. 青岛海洋大学学报, 1993, 23(2):35-42.
- [8] 陈孝焯, 吴志新, 张厚梅. 大黄与黄连对二种淡水虾血细胞吞噬活性的影响[J]. 水生生物学报, 2002, 26(2): 201-204.
- [9] Smith V J, Soderhall K. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates[J]. Developmental and Comparative Immunology, 1991, 15(4): 251-261.
- [10] 管华诗. 海水养殖动物的免疫、细胞培养和病害研究[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1999.
- [11] 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, 2001, 7(4):78-81.
- [12] Chen Jiannchu, Lin Chiyuan. Responses of oxygen consumption, ammonia-N excretion and urea-N excretion of *Penaeus chinensis* exposed to ambient ammonia at different salinity and pH levels[J]. Aquaculture, 1995, 136:243-255.
- [13] 谢忠明. 海水经济蟹类养殖技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.

Effect of Sudden Changes in pH on the Immune Factors of *Scylla paramamosain*

LIU Lu¹, YANG Yu-jiao¹, WANG Guo-liang^{1,2*}

(1.Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2.Medical School, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Taking the healthy *Scylla paramamosain* as the test sample, the vitality of immune factors is examined including total haemocyte count (THC), phagocytic activity, and lysozyme (LZM), super oxide dismutase (SOD), alkaline phosphatase (AKP), acidic phosphatase (ACP), peroxidase (POD), phenoloxidase (PO) and hemolysin activities in the serum under pH 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 for 0, 4, 48, 72, 96 hours, respectively. The results indicate that long time's pH stress may reduce each immune response of *Scylla paramamosain*. It shows that pH mutation can suppress the vitality of immune factors, with THC, LZM, and hemolysin activities being decreased significantly. pH variation of small-scale (pH 7.50 to 7.05 and 7.50 to 8.02) can make the immune indexes increase for a short time followed by decreasing, but pH with significant variation (pH 7.50 to 6.45 and 7.50 to 8.44) can result in remarkable decrease. The immune index of THC in the control group is found to be much higher than that in the experimental groups under 24 hours pH stress. The immune indexes of hemolysin activity in the groups of pH 7.05, 6.45, 8.02 are much lower than that in the control group. The immune indexes of phagocytic activity and ACP in the groups of pH 8.44, 6.45 are much lower than that in the control group. The main immune factors, such as THC, hemolysin, phagocytic activity, PO and POD, can be used as early-warning signals in *Scylla paramamosain* cultivation.

Key words: *Scylla paramamosain*; pH mutation; immune factors; stress

CLC number: S968.25

Document code: A

(责任编辑 史小丽)