

文章编号: 1000-0615(2019)08-1723-10

DOI: 10.11964/jfc.20180611329

## 急性pH和碳酸盐碱度对缢蛏存活率、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase活性及血淋巴吞噬能力的影响

叶博<sup>1</sup>, 程之扬<sup>1</sup>, 彭茂潇<sup>1</sup>, 牛东红<sup>1,2\*</sup>, 刘晓军<sup>1,2</sup>, 蓝天一<sup>1</sup>

(1. 上海海洋大学水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海 201306;

3. 上海海洋大学上海水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306)

**摘要:** 采用静态毒理学实验方法, 分析了2种规格缢蛏(小规格SSc和大规格LSc)在pH和碳酸盐碱度( $C_A$ )急性胁迫条件下的存活率,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase(NKA)活性以及血淋巴的吞噬能力。结果显示, 当 $C_A$ 浓度为2.5 mmol/L、pH值为7.5~9.5时, 2种规格缢蛏的存活率均接近100%; 当pH值大于9.5时, 2种规格缢蛏的存活率均显著下降。当 $C_A$ 浓度为0~44.58 mmol/L、pH值为9.0~10.0时, 随着 $C_A$ 浓度的上升, 缢蛏的存活率明显下降; 在pH值为9.5条件下, LSc的鳃组织NKA活性, 随着 $C_A$ 浓度的上升而升高, LSc血淋巴的吞噬能力随着 $C_A$ 浓度的上升而下降。由此可见, 缢蛏在高pH或高 $C_A$ 下表现出较强的耐受性, 但高pH和高 $C_A$ 协同胁迫下对缢蛏的存活率具有较大的影响, 研究结果为进一步探索缢蛏在盐碱地的养殖提供了一定的理论参考。

**关键词:** 缢蛏; pH; 碳酸盐碱度; 存活率;  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase活性; 吞噬能力; 内陆盐碱水中图分类号: S 917.4 文献标志码: A

盐碱地被认为是一种世界性的低产土地, 盐碱地水土资源的开发利用是目前的研究热点。盐碱水域养殖实践覆盖全球, 主要包括中国、新西兰、澳大利亚、巴基斯坦、前苏联、以色列、伊朗、美国、印度和泰国等国家<sup>[1]</sup>。被试验于盐碱水域养殖的品种众多, 主要包括海水鱼、淡水鱼和海水虾等。国外报道盐碱水域养殖海水鱼类较多<sup>[2-3]</sup>, 而中国报道盐碱水域养殖淡水鱼类较多<sup>[4]</sup>。正是由于泰国第一次成功的在盐碱水域养殖了凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*), 该物种的耐受潜能被人们不断挖掘, 促使其成为全球范围内养殖最广泛的品种<sup>[5]</sup>。盐碱水域养殖贝类的报道较少, 仅见贻贝(*Mytilus edulis*)<sup>[6]</sup>、澳大利亚绿边鲍(*Haliotis laevigata*)<sup>[7]</sup>、大马蹄螺(*Trochus niloticus*)<sup>[8]</sup>、长牡蛎(*Crassostrea gigas*)和悉尼岩牡蛎(*Saccostrea glomerata*)<sup>[9]</sup>, 但是均未见

成功大面积养殖和推广的报道。

中国的盐碱地面积为9 970  $\text{hm}^2$ , 内陆盐碱水面积为3 067  $\text{hm}^2$ <sup>[10]</sup>, 中国的大部分盐碱地地势平坦、便于灌溉, 但是产量极低<sup>[11]</sup>。中国西北内陆盐碱水域具有较高的碳酸盐碱度( $C_A$ )和pH值, 且其主要离子成分及比例与正常海水有很大的差别<sup>[12-13]</sup>。盐碱水中主要离子 $\text{CO}_3^{2-}$ 、 $\text{HCO}_3^-$  ( $C_A$ )、 $\text{OH}^-$  (pH)、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Cl}^-$ 和 $\text{SO}_4^{2-}$ 都被认为在一定程度上影响水生动物的生长和存活<sup>[1, 14-16]</sup>。Hiele等<sup>[17]</sup>认为影响贻贝存活和生长的主要原因是 $\text{Na}^+$ 和 $\text{K}^+$ 比例失调。而高碳酸盐碱度和高pH也被认为是影响盐碱水域养殖的主要原因之一<sup>[14, 18-19]</sup>。在我国仅林听听等<sup>[20]</sup>报道过盐碱水部分因子对青蛤(*Cyclina sinensis*)的致毒影响。在我国利用盐碱水资源养殖经济贝类有利于改善水环境、平衡内陆池塘养殖生态、调节内陆

收稿日期: 2018-06-20 修回日期: 2019-05-16

资助项目: 国家自然科学基金(31472278); 国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA10A400)

通信作者: 牛东红, E-mail: dhniu@shou.edu.cn

渔业经济和增产、增收。

缢蛏(*Sinonovacula constricta*)俗称蛏子、蜻和泥蛏,属软体动物门(Mollusca)、瓣鳃纲(Lamellibranchia)、异齿亚纲(Heterodonta)、帘蛤目(Veneroida)、竹蛏科(Solenidae)、缢蛏属(*Sinonovacula*),是我国第四大年产量最高的海水经济贝类,广泛分布于西太平洋的潮间带和河口地区<sup>[21]</sup>。缢蛏可以适应广温、广盐的环境条件<sup>[22]</sup>,具有繁殖周期短、生长快等特点<sup>[23]</sup>。关于缢蛏在盐度、pH和温度等变化条件下的研究很多<sup>[24-25]</sup>,但是针对急性高 $C_A$ 和pH胁迫下的缢蛏存活和生理活性的研究并未被报道。因此,本实验研究了急性高 $C_A$ 和pH胁迫下对2种规格缢蛏(小规格SSc和大规格LSc)的存活率、 $Na^+/K^+$ -ATPase(NKA)活性以及血淋巴吞噬能力的影响,以期为内陆盐碱水域养殖缢蛏和选育抗盐碱水缢蛏品种提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用的2种规格缢蛏取自浙江台州市三门县东航水产育苗科技有限公司。采集的缢蛏个体大小均匀,其中SSc平均壳长为(2.133±0.128)cm, LSc平均壳长为(4.495±0.246)cm,在室内经7 d暂养后,调整盐度至6。挑选健康有活力的缢蛏用于高pH和 $C_A$ 的急性胁迫试验。

实验用水为淡水添加海盐配制而成的人工海水,由于大多碳酸型盐碱水的盐度在6左右<sup>[26]</sup>,因此,本实验用水的盐度调为6。本实验用水温度控制在20~22 °C,通过添加 $NaHCO_3$ 调节水中的碳酸盐碱度,pH值用0.1 mol/L HCl和0.1 mol/L NaOH进行调节。

### 1.2 实验方法

实验期间,由于实验用水的pH值和碳酸盐碱度会受到空气中的 $CO_2$ 和缢蛏生理活动的影响。因此,通过每天100%的更换实验水的方式以维持pH值稳定。长方型塑料盆(长41 cm、宽32 cm、高10 cm)作为实验容器,实验水体积为2 L。实验组和对照组均设计3个平行组,对照组是盐度为6的人工海水,对48 h健康的缢蛏个体存活率、NKA活性和血淋巴吞噬率进行测定。实验中以观察到缢蛏的壳张开及壳与外套膜脱离作为判断其死亡的标准。

### 1.3 实验设计

实验一:2种规格缢蛏在相同 $C_A$ 、不同pH下的急性胁迫实验 实验的 $C_A$ 设为2.5 mmol/L[实测浓度为(3.74±0.12) mmol/L]。pH值梯度组设7个组,分别为pH7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0和10.5。对照组是不添加碳酸盐的盐度为6的人工海水,每个pH梯度设计3个平行组(每组30个个体)。2种规格的缢蛏同时进行该实验。

实验二:2种规格缢蛏在不同pH、不同 $C_A$ 下的急性胁迫实验 实验组中pH值设3个梯度,分别为9.0、9.5和10.0,每个pH值梯度下设不同浓度梯度的 $C_A$ ,同时测量 $C_A$ 的实测值,其中各pH系列中不添加碳酸盐的组及碳酸盐梯度为0的组作为对照组(表1)。对照组和实验组均设3个平行,每个平行30个个体。

实验三:大规格缢蛏在高pH和 $C_A$ 协同胁迫下的NKA活性和血淋巴吞噬能力 通过对实验二的结果分析半致死浓度(LC<sub>50</sub>)获得pH为9.5时的半致死碳酸盐碱度,实验设置:pH9.5  $C_A$  0 mmol/L(对照组)、pH9.5  $C_A$  12.37 mmol/L、pH9.5  $C_A$  20 mmol/L和pH9.5  $C_A$  30 mmol/L。在每个实验组设计3个平行组(每组30只LSc个体)。分别在处理后的0、12、24和48 h进行取样检测鳃组织NKA活性和血淋巴吞噬能力。0 h时随机挑选18只测量鳃组织NKA活性(n=9)和血淋巴吞噬率(n=9),其余各个时间点每组分别取6只进行鳃组织NKA活性(n=3)和血淋巴吞噬率(n=3)测定。

### 1.4 指标测定、计算及数据分析

水质测定分析方法 实验期间采用数字型精密酸度计测定实验用水pH值;采用酚酞和甲基橙-苯胺蓝作为指示剂,通过酸碱滴定检测 $C_A$ <sup>[27]</sup>。

存活率的计算 存活率(%)=(存活数/总数)×100%

半致死浓度(LC<sub>50</sub>)的计算 采用直线内插法计算LC<sub>50</sub><sup>[28]</sup>,以LC<sub>50</sub>作为急性胁迫指标。

NKA活性的测定 样品组织冰浴匀浆后,用生理盐水稀释后离心(2 500 r/min)获得组织蛋白溶液,采用考马斯亮蓝法测定蛋白含量。NKA活性的测定采用Wheatly等<sup>[29]</sup>的方法,通过测定全酶反应体系和NKA活力被乌本苷抑制反应体系中底物ATPNa<sub>2</sub>释放出无机磷(Pi)量的差值来计算,酶活性单位U采用每小时每毫克蛋白的

表 1 各急性pH系列的碳酸盐碱度设置

Tab. 1 Carbonate alkalinity setting for each acute pH series

pH 9.0		pH 9.5		pH 10.0	
C <sub>A</sub> 梯度/(mmol/L) gradient	实测值/(mmol/L) measured value	C <sub>A</sub> 梯度/(mmol/L) gradient	实测值/(mmol/L) measured value	C <sub>A</sub> 梯度/(mmol/L) gradient	实测值/(mmol/L) measured value
0	1.22 ± 0.08	0	1.38 ± 0.04	0	1.84 ± 0.25
5	4.57 ± 0.33	5	4.13 ± 0.06	1	2.97 ± 0.20
15	14.47 ± 0.42	10	10.66 ± 0.57	3	4.16 ± 0.11
20	19.70 ± 0.59	15	15.63 ± 0.58	5	4.74 ± 0.32
30	30.20 ± 0.50	20	18.93 ± 0.90	7	6.77 ± 0.16
40	38.00 ± 0.85	30	26.28 ± 1.48	10	9.41 ± 0.34
50	45.00 ± 0.93	40	38.51 ± 0.54	13	11.96 ± 0.11
		50	44.58 ± 1.82	15	14.10 ± 0.21
				20	17.94 ± 0.41

微摩尔无机磷( $\mu\text{molPi}/\text{mgprot}/\text{hour}$ )表示。

**吞噬率计算** 采用15 mL的注射器在缢蛏的心脏位置抽取血淋巴。将采集的血淋巴用40  $\mu\text{m}$ 孔径组织筛去除组织颗粒, 获得均匀缢蛏血淋巴悬液。每400  $\mu\text{L}$ 血淋巴加入10  $\mu\text{L}$ 经1/10稀释的Fluorospheres<sup>®</sup>改性羧酸荧光微球(直径1  $\mu\text{m}$ , 黄绿色荧光, Invitrogen)在黑暗室温下孵育1 h<sup>[30]</sup>。使用BD C6 Plus(BD Biosciences公司)流式细胞仪进行体外细胞吞噬荧光微球的能力评价分析。采用流式细胞仪测定同样浓度的各个测定管未处理血淋巴(对照管)获得该组细胞浓度和设定阈值, 设阈值为Gate A(仅细胞), 测定管和对照管细胞分布图以细胞相对大小(FSC值)和FITC荧光强度(FITC值)表示。每个组进行3次技术重复测定, 每次测定20  $\mu\text{L}$ 液体。

吞噬率(%)=(所有细胞-未被吞噬的细胞)/所有细胞 $\times 100\%$ 。

**统计分析** 统计分析使用SPSS 19.0统计软件进行。所有数据经过Tukey检验进行方差分析, 分析处理组之间的差异显著性。使用Sigmaplot 12.3绘制结果图。

## 2 结果

### 2.1 2种规格缢蛏在相同C<sub>A</sub>浓度、不同pH条件下的急性胁迫试验

在C<sub>A</sub>为2.5 mmol/L、pH值为7.5~9.5时, SSc和LSc存活率均接近100%; pH值在9.5以上时, SSc和LSc的存活率均下降明显, SSc的存活率低

于LSc; pH值达到10.5以上时, SSc和LSc在实验开始后24 h内就已全部死亡(图1)。该实验SSc和LSc 48小时pH-LC<sub>50</sub>分别为pH 9.87和pH 9.97(表2)。

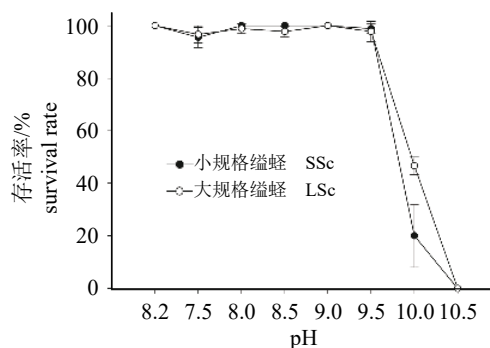


图 1 两种规格缢蛏在相同C<sub>A</sub>浓度、不同pH条件下的存活率

图中横坐标处的pH 8.2为对照组

Fig. 1 Survival rate of two sizes of *S. constricta* at the same C<sub>A</sub> concentration and different pH conditions

The pH 8.2 at the abscissa in the figure is the control group

### 2.2 小规格缢蛏在不同pH、不同C<sub>A</sub>条件下的急性胁迫试验

在同一C<sub>A</sub>条件下, SSc的存活率随着pH值的增大而下降。在同一pH条件下, 随着C<sub>A</sub>的增加, SSc的存活率下降; 在pH 9.0组中, 当C<sub>A</sub>超过40 mmol/L时, SSc的存活率为0; 在pH 9.5组中, 当C<sub>A</sub>超过30 mmol/L时, SSc的存活率为0;

表 2 两种规格缙蛭在急性pH和C<sub>A</sub>胁迫下的48 h LC<sub>50</sub>

Tab. 2 48 h LC<sub>50</sub> of two size *S. constricta* under acute pH and C<sub>A</sub> stress

缙蛭规格 <i>S. constricta</i> specification	同一C <sub>A</sub> 下不同的pH different pH at the same C <sub>A</sub>		同一pH下不同的C <sub>A</sub> different C <sub>A</sub> at the same pH	
	C <sub>A</sub> /(mmol/L)	pH-LC <sub>50</sub>	pH	C <sub>A</sub> -LC <sub>50</sub> /(mmol/L)
小规格 SSc	2.5	9.87	9.0	11.79
			9.5	9.75
			10.0	3.43
大规格 LSc	2.5	9.97	9.0	14.22
			9.5	12.37
			10.0	4.16

在pH 10.0组中，当C<sub>A</sub> 超过10 mmol/L时，SSc的存活率为0(图2)。pH为9.0、9.5和10.0时，SSc的48 h C<sub>A</sub>-LC<sub>50</sub>值分别为11.79、9.75和3.43 mmol/L(表2)。

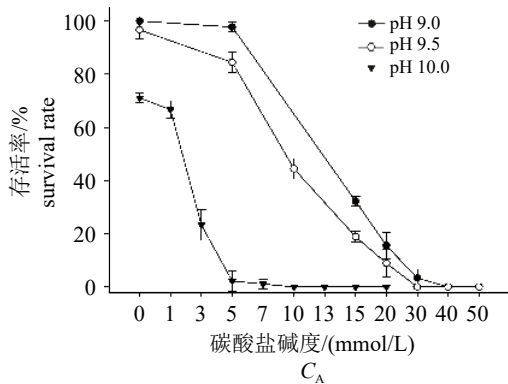


图 2 小规格缙蛭在不同pH、不同C<sub>A</sub>条件下的存活率  
Fig. 2 The survival rate of small size *S. constricta* under different pH and different C<sub>A</sub> conditions

### 2.3 大规格缙蛭在不同pH、不同C<sub>A</sub>条件下的急性胁迫试验

在同一C<sub>A</sub>浓度下，LSc的存活率随着pH值的升高而下降；当C<sub>A</sub>超过1 mmol/L时，与pH 9.0和pH 9.5相比，pH 10.0的存活率较低。在相同pH条件下，随着C<sub>A</sub>的增加，LSc的存活率下降；在pH 9.0组中，当C<sub>A</sub> 超过50 mmol/L时，LSc的存活率为0；在pH 9.5组中，当C<sub>A</sub> 超过30 mmol/L时，LSc的存活率为0；在pH 10.0组中，当C<sub>A</sub> 超过13 mmol/L时，LSc的存活率为0(图3)。pH 9.0、9.5和10.0的LSc 48 h C<sub>A</sub>-LC<sub>50</sub>值分别为14.22、12.37和4.16 mmol/L(表2)。

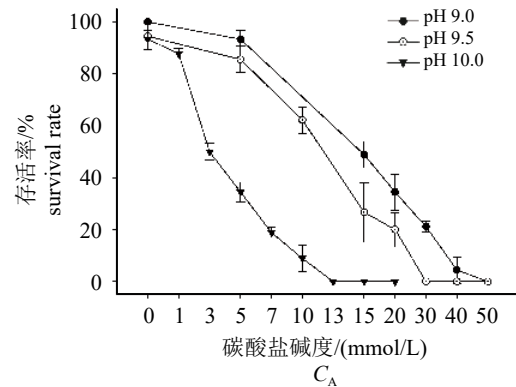


图 3 大规格缙蛭在不同pH、不同C<sub>A</sub>条件下的存活率  
Fig. 3 The survival rate of large size *S. constricta* under different pH and different C<sub>A</sub> conditions

### 2.4 大规格缙蛭在高pH和C<sub>A</sub>急性胁迫下的NKA活性

在pH 9.5时，与对照组相比，各实验组LSc的鳃组织NKA活性随着C<sub>A</sub>浓度的增大，呈现先降低后升高，各实验组在12 h达到最低值，对照组的变化趋势平稳；在12 h时，C<sub>A</sub> 12.37 mmol/L组与对照组的鳃组织NKA活性无显著性差异，和其他实验组相比，C<sub>A</sub> 30 mmol/L组的鳃组织NKA活性最低。在24 h后，和其它实验组相比，C<sub>A</sub> 30 mmol/L组的鳃组织NKA活性最高(图4)。

### 2.5 大规格缙蛭在高pH和C<sub>A</sub>急性胁迫下血淋巴的吞噬能力

在相同pH条件下，各实验组LSc血淋巴的吞噬能力随着C<sub>A</sub>的增加而降低，C<sub>A</sub> 0 mmol/L(对照组)相对稳定，与其他实验组相比，C<sub>A</sub> 30 mmol/L组LSc血淋巴的吞噬能力下降趋势比较大(图5)。

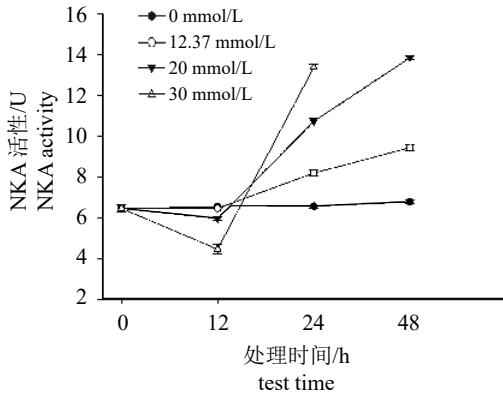


图4 大规格缢蛏在高pH和C<sub>A</sub>急性胁迫下的NKA活性  
图中C<sub>A</sub> 30 mmol/L没有48 h的数据, 是由于个体在24 h以后存活率为0; 下同

Fig. 4 NKA activity of large size *S. constricta* under high pH and C<sub>A</sub> acute stress

The reason for C<sub>A</sub> 48 mmol/L without 48 h is that the individual has a survival rate of 0 after 24 h; the same below

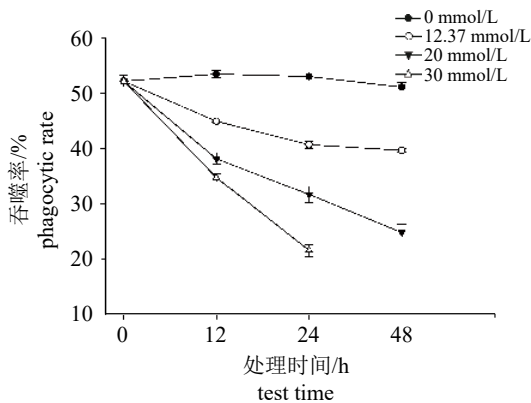


图5 大规格缢蛏在高pH和C<sub>A</sub>急性胁迫下血淋巴的吞噬能力

Fig. 5 Phagocytosis of hemolymph of large size *S. constricta* under high pH and C<sub>A</sub> acute stress

### 3 讨论

#### 3.1 pH、C<sub>A</sub>对缢蛏存活率的影响

水生动物体内存在CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>和-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>缓冲系统<sup>[31]</sup>。水生动物能够通过这种缓冲系统来进行渗透调节, 使其体内趋于接近中性的pH值, 维持体内酸碱平衡, 由于细胞和生物体的体内缓冲体系能够承受外界一定范围pH的变化, 但当超过缓冲极限时, 体内的pH值会发生急剧变化, pH值的变化会破坏生物体的体液平衡, 进而影响生物体的正常生理活动, 甚至导致生物体死亡<sup>[32-34]</sup>。实验结果可知, 环境pH 9.5至10.5的范围

是缢蛏体内缓冲系统不能急性缓冲的范围, 当pH值超过10.5时缢蛏全部死亡, 原因可能是该pH值已经完全破坏了缢蛏体内的缓冲系统, 打破其体液平衡。缢蛏规格越大其体内的缓冲能力越强, 因此, SSc存活率下降的趋势比LSc的大, 由此可见, 缢蛏规格越大, 其对盐碱环境中高pH的耐受能力越强。

本实验表明, 在同一pH条件下, 随着C<sub>A</sub>的升高, 2种规格的缢蛏的存活率显著降低。有研究发现, 水中C<sub>A</sub>升高会引起水生动物鳃组织的表面损伤, 以及影响鳃表皮细胞外表面的功能<sup>[35]</sup>。其他类似研究同样发现, 短时间暴露在高C<sub>A</sub>的鳃上皮细胞可能出现增殖或肥大<sup>[36]</sup>。从结果分析发现, 随着C<sub>A</sub>的升高, C<sub>A</sub>对缢蛏的致毒作用越大, 缢蛏的存活率越低。pH和C<sub>A</sub>存在协同致毒效应, 在水中pH和C<sub>A</sub>之间存在平衡: OH<sup>-</sup> + HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> → CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> + H<sub>2</sub>O, pH或C<sub>A</sub>浓度的升高将导致CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>浓度的升高, 而CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>具有对水生动物有较高毒性作用<sup>[37-38]</sup>。因此, pH 10.0系列组C<sub>A</sub>的半致死浓度远小于pH 9.0系列组, 据此, pH和C<sub>A</sub>的协同作用下对缢蛏的生存有重要的影响。

#### 3.2 高pH、高C<sub>A</sub>对缢蛏鳃组织NKA活性的影响

NKA广泛存在于生物的细胞质膜上, 是一种常见的跨膜蛋白, 可以直接参与调控细胞内Na<sup>+</sup>浓度, 也可以为其他离子调节提供能量<sup>[39]</sup>。本研究表明, 在pH 9.5时, 随着C<sub>A</sub>的上升, LSc的鳃组织NKA活性先降低后升高。而一些研究显示, pH胁迫(pH 9.5)对凡纳滨对虾鳃丝NKA活性的影响, 表现为随着处理时间延长呈峰值变化, 先上升后下降最后趋于稳定<sup>[40]</sup>。高pH胁迫导致克氏原螯虾(*Procambarus clarkia*)鳃NKA的活力呈上升趋势<sup>[41]</sup>。有关盐碱正交试验中发现, 当外界环境中离子浓度发生变化时, 大鳞鲃(*Barbus capito*)鳃丝NKA活力会做出相应的调整, 对暴露在一定浓度的C<sub>A</sub>盐溶液中的鳃组织进行离子交换起到了阻碍作用, 为了维持鳃组织离子通道畅通, 鳃丝NKA的活力水平会相应的提高<sup>[42]</sup>。本研究中, 在高pH以及逐渐升高C<sub>A</sub>浓度的条件下, 鳃组织NKA活力在实验开始后有所下降趋势, 说明在面对高pH以及逐渐升高C<sub>A</sub>浓度的刺激下时, 会使LSc的鳃组织NKA在短时间内快速消耗, 因此抑制了NKA的活性, 这导致机体内

原始渗透压平衡被打破。鳃丝NKA活力在胁迫12 h时活力迅速升高,说明LSc在面对高pH以及逐渐升高的 $C_A$ 浓度刺激下时,可以通过提高自身的渗透适应能力来维持体内离子平衡和pH稳定。随着时间的推移,大量的NKA蛋白被表达进而平衡体内的渗透压,即LSc的鳃组织NKA活力会做出相应的调整,因此促进了NKA活性的上升从而维持体内渗透压平衡。这样的结果与本实验室先前的研究结果相似,值得一提的是,在高pH和 $C_A$ 浓度的条件下NKA的酶活性会在较长一段时间内被上调而非短暂上调<sup>[43]</sup>。

### 3.3 高pH、高 $C_A$ 对缢蛏血淋巴吞噬能力的影响

水生无脊椎动物的血淋巴是机体免疫系统的重要部分,而其吞噬作用是双壳贝类的重要防御机制,但其吞噬能力也容易受环境胁迫的影响<sup>[44]</sup>。欧洲生产的多变鲍(*Haliotis varia*)在环境胁迫(振动胁迫)中出现血淋巴吞噬能力降低现象<sup>[45]</sup>;青蛤暴露在高pH和高 $C_A$ 下,其血淋巴细胞的吞噬能力下降<sup>[22]</sup>。高pH和高 $C_A$ 甚至会导致细胞内溶酶体酶和免疫相关的细胞器功能受损<sup>[46]</sup>。受环境胁迫(盐度骤降和长时间低盐胁迫)时,贝类等血细胞的吞噬能力随盐度的降低而降低,这可能是双壳贝类在应激时产生去甲肾上腺素,从而抑制了其吞噬能力<sup>[47]</sup>。本实验中,在高pH和 $C_A$ 急性胁迫下,LSc血淋巴吞噬能力随着 $C_A$ 的增大而降低。这符合吴芳丽等<sup>[44]</sup>人的观点,当环境发生急性变化时,缢蛏受应激可能产生去甲肾上腺素,从而抑制了其血淋巴吞噬能力<sup>[48]</sup>,因此导致LSc血淋巴吞噬能力下降。另外,高pH、高 $C_A$ 的刺激也会导致LSc体内生理功能的紊乱,这也可能是导致血淋巴吞噬能力下降的一个重要原因。

综上所述,缢蛏在高pH或高 $C_A$ 浓度的胁迫下,大小规格的缢蛏均表现出较强的耐受性,与小规格的缢蛏相比,大规格的缢蛏的耐受性较强,存活率较高;在高pH和高 $C_A$ 浓度的协同作用下,对大小规格缢蛏的存活率有较大的影响,pH和 $C_A$ 浓度越高,存活率越低。研究结果为进一步探索缢蛏在盐碱地的养殖提供了一定的数据支撑。

叶博和程之扬是共同第一作者。

### 参考文献:

- [1] Dinh H Q. Cultural biology of the blue mussel, *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758) in inland saline water in Western Australia[D]. Bentley WA: Curtin University of Technology, 2016: 1-141.
- [2] Fielder D S, Bardsley W J, Allan G L. Survival and growth of Australian snapper, *Pagrus auratus*, in saline groundwater from inland New South Wales, Australia[J]. *Aquaculture*, 2001, 201(1-2): 73-90.
- [3] Doupé R G, Sarre G A, Partridge G J, et al. What are the prospects for black bream *Acanthopagrus butcheri* (Munro) aquaculture in salt-affected inland Australia?[J]. *Aquaculture Research*, 2005, 36(14): 1345-1355.
- [4] 李吉方,董双林,文良印,等.盐碱地池塘4种养殖模式的鱼产量及负荷力[J]. *中国水产科学*, 2002, 9(4): 340-345.  
Li J F, Dong S L, Wen L Y, et al. Fish productivity and carrying capacity of four polyculture systems in saline-alkaline chloride water ponds[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2002, 9(4): 340-345(in Chinese).
- [5] Roy L A, Davis D A, Saoud I P, et al. Shrimp culture in inland low salinity waters[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2010, 2(4): 191-208.
- [6] Dinh H Q, Fotedar R. Early development of the blue mussel *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758) cultured in potassium-fortified inland saline water[J]. *Aquaculture*, 2016, 452: 373-379.
- [7] Doupé R G, Lymbery A J, Starcevich M R. Rethinking the land: the development of inland saline aquaculture in Western Australia[J]. *International Journal of Agricultural Sustainability*, 2003, 1(1): 30-37.
- [8] Lee C L, Lynch P W. Design and operation of a land-based closed recirculating hatchery system for the topshell, *Trochus niloticus* using treated bore water[C]//Trochus: Status, Hatchery Practice and Nutrition Workshop, Proceedings of A Workshop Held at Northern Territory University. Darwin, NT: Northern Territory University, 1997: 27-32.
- [9] Ingram B A, McKinnon L J, Gooley G J. Growth and survival of selected aquatic animals in two saline groundwater evaporation basins: an Australian case study[J]. *Aquaculture Research*, 2002, 33(6): 425-436.
- [10] 贾恢先.中国西北内陆盐渍化防治与可持续农业的研究[J]. *西北植物学报*, 2003, 23(6): 1063-1068.

- Jia H X. Soil salinization control and sustainable agriculture in north-west endoland region of China[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2003, 23(6): 1063-1068(in Chinese).
- [11] Qadir M, Ghafoor A, Murtaza G. Amelioration strategies for saline soils: a review[J]. *Land Degradation & Development*, 2001, 12(4): 357-386.
- [12] 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.* Studies on the commercially experimental culture of penaeid shrimp, *Penaeus chinensis*, transplanted to the northwest inland salt waters[J]. *Marine Fishery*, 1997(1): 9-12(in Chinese).
- [13] 王佳丽, 黄贤金, 钟太洋, 等. 盐碱地可持续利用研究综述[J]. *地理学报*, 2011, 66(5): 673-684.
- Wang J L, Huang X J, Zhong T Y, *et al.* Review on sustainable utilization of salt-affected land[J]. *Acta Geographica Sinica*, 2011, 66(5): 673-684(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] Rijstenbil J W, Gerringa L J A. Interactions of algal ligands, metal complexation and availability, and cell responses of the diatom *Ditylum brightwellii* with a gradual increase in copper[J]. *Aquatic Toxicology*, 2002, 56(2): 115-131.
- [16] Partridge G J. Inland saline aquaculture: overcoming biological and technical constraints towards the development of an industry[D]. Murdoch, WA: Murdoch University, 2008.
- [17] Van der Hiele T, Rijstenbil J W, Creemers J, *et al.* Composition, treatment and use of saline groundwater for aquaculture in the Netherlands saline groundwater composition and chemistry[J]. *World Aquaculture*, 2014: 23-27.
- [18] 杨富亿, 孙丽敏, 杨欣乔. 碳酸盐碱度对南美白对虾幼虾的毒性作用[J]. *水产科学*, 2004, 23(9): 3-6.
- Yang F Y, Sun L M, Yang X Q. Toxicity of carbonate alkalinity to *Penaeus vannamei* juveniles[J]. *Fisheries Science*, 2004, 23(9): 3-6(in Chinese).
- [19] 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).
- [20] 林听听, 来琦芳, 陆建学, 等. 几种盐碱因子对青蛤的致毒效应[J]. *海洋渔业*, 2012, 34(2): 183-188.
- Lin T T, Lai Q F, Lu J X, *et al.* Toxic effects of several saline-alkali factors on *Cyclina sinensis*[J]. *Marine Fisheries*, 2012, 34(2): 183-188(in Chinese).
- [21] 谢淑媚, 牛东红, 阮海灯, 等. 缢蛏IGFBP基因结构及生长性状相关SNP筛选[J]. *水产学报*, 2015, 39(6): 799-809.
- Xie S M, Niu D H, Ruan H D, *et al.* Molecular characterization of IGFBP and association analysis with growth traits in the razor clam *Sinonovacula constricta*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(6): 799-809(in Chinese).
- [22] 刘达博, 牛东红, 姜志勇, 等. 缢蛏7群体的形态差异与判别分析[J]. *海洋渔业*, 2009, 31(4): 363-368.
- Liu D B, Niu D H, Jiang Z Y, *et al.* Morphological variations and discriminant analysis of seven populations of *Sinonovacula constricta*[J]. *Marine Fisheries*, 2009, 31(4): 363-368(in Chinese).
- [23] 牛东红, 李家乐, 汪桂玲, 等. 缢蛏六群体16S *rRNA*基因片段序列的差异分析[J]. *上海水产大学学报*, 2007, 16(1): 1-6.
- Niu D H, Li J L, Wang G L, *et al.* The genetic diversity of mitochondrial 16S *rRNA* gene fragment in six populations of *Sinonovacula constricta*[J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2007, 16(1): 1-6(in Chinese).
- [24] 范德朋, 潘鲁青, 马甦, 等. 盐度和pH对缢蛏耗氧率及排氨率的影响[J]. *中国水产科学*, 2002, 9(3): 234-238.
- Fan D M, Pan L Q, Ma S, *et al.* Effects of salinity and pH on oxygen consumption rate and ammonia excretion rate in *Sinonovacula constricta*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2002, 9(3): 234-238(in Chinese).
- [25] 林笔水, 吴天明. 温度和盐度对缢蛏浮游幼虫发育的影响[J]. *生态学报*, 1984, 4(4): 385-392.

- Lin B S, Wu T M. The effects of temperature and salinity on the larvae of *Sinonovacula Constricta* (Lamarck)[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 1984, 4(4): 385-392(in Chinese).
- [26] 么宗利, 王慧, 周凯, 等. 碳酸盐碱度和pH值对凡纳滨对虾仔虾存活率的影响[J]. *生态学杂志*, 2010, 29(5): 945-950.
- Yao Z L, Wang H, Zhou K, *et al.* Effects of water carbonate alkalinity and pH on survival rate of post-larval *Litopenaeus vannamei*[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2010, 29(5): 945-950(in Chinese).
- [27] 肖玲. 水中碱度测定的研究[J]. *化工技术与开发*, 2004, 33(6): 42-44.
- Xiao L. Study on indicator selection for determination of water alkalify[J]. *Technology & Development of Chemical Industry*, 2004, 33(6): 42-44(in Chinese).
- [28] Stephan C. Methods for calculating an LC<sub>50</sub>[M]. Washington: U. S. Environmental Protection Agency, 1977: 65-84.
- [29] Wheatly M G, Henry R P. Branchial and antennal gland Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-dependent ATPase and carbonic anhydrase activity during salinity acclimation of the euryhaline crayfish *Pacifastacus leniusculus*[J]. *Journal of Experimental Biology*, 1987, 133(1): 73-86.
- [30] 王有基, 林江兴, 李琼珍, 等. 翡翠贻贝血淋巴细胞亚群鉴定及相关免疫功能的流式细胞分析[J]. *水产学报*, 2014, 38(3): 385-399.
- Wang Y J, Lin J X, Li C Z, *et al.* Characterization of the subpopulation and flow cytometric analysis of immune-related parameters of hemocytes in the green-lipped mussel *Perna viridis*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(3): 385-399(in Chinese).
- [31] Deaton L E. Osmotic and ionic regulation in molluscs[M]. New York: CRC Press, 2008: 107-133.
- [32] Breitwieser G E, Altamirano A A, Russell J M. Effects of pH changes on sodium pump fluxes in squid giant axon[J]. *The American Journal of Physiology*, 1987, 253: C547-C554.
- [33] 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): 758-764.
- Zhang L J, Pan L Q, Luan Z H. Effects of pH on ion-transport enzyme activities and survival, growth of *Marsipenaeus japonicus* postlarvae[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(5): 758-764(in Chinese).
- [34] 张永普, 肖国强, 林立祝, 等. pH和氨氮对橄榄蚶耐受性的影响[J]. *四川动物*, 2009, 28(1): 73-76.
- Zhang Y P, Xiao G Q, Lin L Z, *et al.* Effects of pH and ammonia-N on tolerance of *Estellarca olivacea*[J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2009, 28(1): 73-76(in Chinese).
- [35] 郑伟刚, 张兆琪, 张美昭, 等. 盐度与碱度对花鲈幼鱼的毒性研究[J]. *中国生态农业学报*, 2005, 13(3): 116-118.
- Zheng W G, Zhang Z Q, Zhang M Z, *et al.* Toxicity of salinity and alkalinity to *Lateolabrax japonicus* fingerlings[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2005, 13(3): 116-118(in Chinese).
- [36] Galat D L, Post G, Keefe T J, *et al.* Histological changes in the gill, kidney and liver of Lahontan cutthroat trout, *Salmo clarki henshawi*, living in lakes of different salinity - alkalinity[J]. *Journal of Fish Biology*, 1985, 27(5): 533-552.
- [37] 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).
- [38] 赵丽慧, 赵金良, Jeerawat T, *et al.* 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).
- [39] Hirose S, Kaneko T, Naito N, *et al.* Molecular biology of major components of chloride cells[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B-Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 136(4): 593-620.
- [40] 潘鲁青, 刘志, 姜令绪. 盐度、pH变化对凡纳滨对虾鳃丝Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-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<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2004, 34(5): 787-790(in Chinese).
- [41] 陶易凡, 强俊, 王辉, 等. 高pH胁迫对克氏原螯虾的急



- 性毒性和鳃、肝胰腺中酶活性及组织结构的影响[J]. 水产学报, 2016, 40(11): 1694-1704.
- Tao Y F, Qiang J, Wang H, *et al.* Acute toxicity of high pH stress and its effect on enzymes activity and histological structure of gill and hepatopancreas in *Procambarus clarkii*[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(11): 1694-1704(in Chinese).
- [42] 耿龙武, 徐伟, 李池陶, 等. 盐碱对大鳞鳃血清渗透压、离子含量及鳃丝Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶活力的影响[J]. 中国水产科学, 2011, 18(2): 458-465.
- Geng L W, Xu W, Li C T, *et al.* Influence of salinity and alkalinity on serum ion concentrations, serum osmosis and gill Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity of *Barbus capito*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(2): 458-465(in Chinese).
- [43] Peng M X, Ye B, Liu X J, *et al.* Effects of alkalinity and pH on survival, growth and enzyme activities in juveniles of the razor clam, *Sinonovacula constricta*[J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 552.
- [44] 吴芳丽, 王月, 尚跃勇, 等. 水生无脊椎动物血淋巴细胞分类及免疫研究进展[J]. 大连海洋大学学报, 2016, 31(6): 696-704.
- Wu F L, Wang Y, Shang Y Y, *et al.* Current progress of research on classification and immunity of hemocytes in aquatic invertebrates: a review[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2016, 31(6): 696-704(in Chinese).
- [45] Malham S K, Lacoste A, Gélébart F, *et al.* Evidence for a direct link between stress and immunity in the mollusc *Haliotis tuberculata*[J]. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 2003, 295A(2): 136-144.
- [46] 刘敏. 不同温度和盐度对施氏獭蛤消化酶和免疫酶活力的影响[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2015.
- Liu M. Effects of temperature and salinity on enzymatic activity of digestive and immunity in *Lutraria sieboldii* reeve[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2015(in Chinese).
- [47] 杨东敏, 张艳丽, 丁鉴锋, 等. 高温、低盐对菲律宾蛤仔免疫能力的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2017, 32(3): 302-309.
- Yang D M, Zhang Y L, Ding J F, *et al.* Synergistic effects of high temperature and low salinity on immunity of Manila clam *Ruditapes philippinarum*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2017, 32(3): 302-309(in Chinese).
- [48] Lacoste A, Malham S K, Cueff A, *et al.* Noradrenaline modulates oyster hemocyte phagocytosis via a  $\beta$ -adrenergic receptor-cAMP signaling pathway[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2001, 122(3): 252-259.

## Effects of pH and carbonate alkalinity on survival rate, $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity and phagocytic ability of the razor clam (*Sinonovacula constricta*)

YE Bo<sup>1</sup>, CHENG Zhiyang<sup>1</sup>, PENG Maoxiao<sup>1</sup>, NIU Donghong<sup>1,2\*</sup>, LIU Xiaojun<sup>1,2</sup>, LAN Tianyi<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Shanghai Collaborative Innovation Centre for Aquatic Animal Genetics and Breeding, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** In this study, a static toxicology experiment was conducted to analyze the survival rate,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (NKA) activity and phagocytic ability of the hemolymph of *Sinonovacula constricta* of two different sizes (small-size SSc and large-size LSc) under the acute stress of high pH and carbonate alkalinity ( $C_A$ ). The results showed that when the  $C_A$  concentration was 2.5 mmol/L and the pH was 7.5–9.5, the survival rates of the two sizes were close to 100%. When the pH value was greater than 9.5, the survival rates of the two sizes were significantly decreased. When the concentration of  $C_A$  was 0–44.58 mmol/L and the pH value was 9.0–10.0, the survival rate of clams decreased with the increase of  $C_A$  concentration. Under the condition of pH 9.5, the NKA activity of LSc gill tissue increased with the increase of  $C_A$  concentration, and the phagocytic capacity of LSc haemolymph decreased with the increase of  $C_A$  concentration. It can be seen that *S. constricta* showed strong tolerance to high pH or  $C_A$ , but high pH and  $C_A$  had a great effect on the survival rate of *S. constricta*. The research results provide a theoretical reference for further exploration of breeding of *S. constricta* in saline-alkali soil.

**Key words:** *Sinonovacula constricta*; pH; carbonate alkalinity; survival rate;  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity; phagocytic ability; inland saline waters

**Corresponding author:** NIU Donghong. E-mail: dhniu@shou.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31472278); National High Technology Research and Development Program of China (2012AA10A400)