



## pH 水平和昼夜变化对池塘养殖凡纳滨对虾成活率的影响

陆羚子, 王岩\*, HASAN Md Mehadi

(浙江大学海洋学院, 浙江 舟山 316200)

**摘要:** 为评价不同 pH 水平和昼夜变化幅度对凡纳滨对虾成活率的影响, 采用单因素实验设计, 实验 I 设 4 个 pH 水平: 6.6(P1)、7.6(P2)、8.6(P3) 和 9.6(P4), 以温室养殖池塘内的平均 pH 水平 (8.2) 为对照 (P0); 实验 II 设 3 个 pH 昼夜变化幅度: 7.5~8.2(PV1)、7.5~9.5(PV2) 和 7.5~10.0(PV3), 以养殖池塘的平均 pH 昼夜变化幅度 (7.5~8.7) 为对照 (PV0)。结果显示, 环境 pH 水平可显著影响对虾成活率、血淋巴颗粒细胞数以及血淋巴中超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、谷胱甘肽还原酶 (GR)、过氧化氢酶 (CAT)、酚氧化酶 (PO) 和诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 的活性。P4 水槽内对虾成活率显著低于 P0、P1、P2 和 P3 水槽, 同时其血淋巴 SOD、GSH-Px、GR、CAT、PO 和 iNOS 的活性较后者不同程度地下降。pH 昼夜变化幅度可显著影响对虾成活率、血淋巴 SOD、GSH-Px、GR 和 CAT 活性, 但对血淋巴谷胱甘肽含量无显著影响。PV2 和 PV3 水槽内对虾成活率显著低于 PV0 和 PV1 水槽, 同时其血淋巴 SOD、GSH-Px、GR 和 CAT 活性较后者不同程度地降低。研究表明, 环境 pH 水平及昼夜变化幅度可显著影响凡纳滨对虾的成活率。鉴于对虾死亡率变化伴随血淋巴 SOD、GSH-Px、CAT 和 PO 活性的变化, 初步认为对虾死亡与 pH 胁迫产生的应激有关。因此, 调控 pH 应是对虾池塘养殖水质管理中的一项重要措施。

**关键词:** 凡纳滨对虾; pH; 成活率; 抗氧化酶; 血淋巴细胞; 谷胱甘肽

**中图分类号:** S 968.22

**文献标志码:** A

水产养殖生产的效益与养殖环境状况密切相关, 当环境恶化时养殖动物生长停滞、免疫功能下降, 同时病原生物数量增加, 病害频发<sup>[1]</sup>。在水产养殖池塘中, 各种环境因子随养殖时间延长和季节交替呈现长期变化趋势, 同时部分环境因子, 如溶解氧 (DO) 和 pH, 每天随池塘生物群落代谢的昼夜变化而表现出节律性波动<sup>[2]</sup>。例如, 水中 DO 含量和 pH 水平从清晨到傍晚随浮游植物光合作用增强而逐渐上升, 从傍晚至次日清晨随浮游植物光合作用减弱而逐渐下降。了解环境因子昼夜变化规律及其对水产养殖动物健康和生长的影响对于完善池塘养殖管理措施具有指导作用。

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 是世界上养殖产量最大的对虾品种。2018 年, 我国凡纳滨对虾养殖产量为 111.75 万 t, 占对虾养殖产量的 79% 以上<sup>[3]</sup>。目前, 我国凡纳滨对虾养殖生产中面临的主要问题是病害难以预见, 养殖风险较大。尽管普遍认为养殖环境恶化是诱发病害并造成凡纳滨对虾大量死亡的重要原因, 但究竟哪些环境因子恶化导致对虾死亡尚无定论。研究表明, pH 是影响凡纳滨对虾生长的环境因子之一<sup>[4]</sup>。在一些对虾养殖池塘中, pH 昼夜变化幅度可超过 3.5 (6.6~10.2)<sup>[2]</sup>, 而 pH 过高或过低均会对各种水生生物, 包括养殖动物、浮游生物和细菌等产生负面影响<sup>[5]</sup>。李云梦等<sup>[6]</sup>2016 年

收稿日期: 2019-10-12 修回日期: 2020-01-24

资助项目: 国家科技支撑计划 (2015BAD13B04)

通信作者: 王岩, E-mail: ywang@zju.edu.cn

发现绍兴部分滩涂围垦养殖池塘中凡纳滨对虾大量死亡时水体的pH在上午往往超过8.4, 推测对虾死亡可能与pH过高有关, 但其观点尚未得到实验检验。有关pH水平对水生动物存活和代谢的影响方面已积累了较多的资料, 其中涉及pH昼夜变化幅度的影响报道尚不多见<sup>[1,5]</sup>。本实验报道了不同pH水平及昼夜变化幅度下舟山温室池塘养殖凡纳滨对虾的成活率、血淋巴细胞数以及血淋巴中抗氧化酶和代谢酶的活性, 目的是明确环境pH对凡纳滨对虾存活和健康的影响, 为改进对虾池塘养殖水质管理技术提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 凡纳滨对虾与养殖系统

实验于2018年8月15日—2018年10月30日在浙江省舟山市水产研究所朱家尖实验场进行。实验场内自东向西建有6个温室大棚, 每个大棚内建有1口长40 m、宽20 m、四周向中心逐渐加深(最大水深为2 m)的水泥池。每个池塘的进水口位于南侧, 排水口位于池塘中心, 东南角和西北角各配置一台水车式增氧机, 池底沿南北方向平行铺设5排(间距约3 m)的纳米增氧管(由罗兹鼓风机供气)。实验所用的凡纳滨对虾捕自其中一口温室养殖池塘(2018年5月30日放养虾苗, 虾苗密度为400尾/m<sup>2</sup>)。该池塘养殖管理措施: 每天06:00、11:00、16:00和21:00分别向池塘内投喂浙江天邦饲料股份有限公司生产的对虾配合饲料(粗蛋白含量为43%, 脂肪含量为7%), 09:00向池塘内泼洒1次EM菌; 每天开动水车式增氧机20 h(每次投喂配合饲料时关闭水车式增氧机1 h), 每天开动底增氧系统24 h。

所用养殖系统由40个聚乙烯(PE)圆桶形水槽(直径50 cm, 高80 cm, 容积150 L)、供水系统(潜水泵、PVC水管和阀门)和增氧系统(漩涡式气泵、PVC气管、阀门和气石)组成。所用的海水为经过沉淀和砂滤的海水, 水温为(28.2±1.5)°C, 盐度为30±1。

### 1.2 实验设计

设计2个单因素实验(I和II), 分别检验pH水平和昼夜变化幅度的影响。实验I中设5个pH水平: 6.6(P1)、7.6(P2)、8.6(P3)和9.6(P4), 以养殖池塘内平均pH水平(8.2)为对照(P0)。实验II设3个pH昼夜变化幅度: 7.5~8.2(PV1)、7.5~

9.5(PV2)和7.5~10.0(PV3), 以养殖池塘的平均pH昼夜变化幅度(7.5~8.7)为对照(PV0)。温室池塘内pH水平和昼夜变化幅度按如下方法确定: 选择6口池塘, 从05:00至19:00隔1 h测定每口池塘内的pH, 以6口池塘一天中pH平均值为池塘平均pH水平, 以一天中pH的最高值和最低值之差为昼夜变化幅度。

### 1.3 实验过程和采样

实验I 不同pH水平下凡纳滨对虾成活率、血淋巴细胞计数、血淋巴抗氧化酶和代谢酶活性的测定。

实验前从温室池塘中捕捞并挑选出3 000尾体长相近、健康的对虾, 暂养在10个PE圆桶形水槽(直径90 cm, 高100 cm, 容积为500 L)中, 每天06:00、12:00和18:00投喂对虾配合饲料, 18:30换水(换水量约为200 L)。1周后将对虾从暂养水槽捕出, 随机放入30个实验水槽中(对虾密度为80尾/水槽)。分别用HCl(浓度4 mol/L)或NaOH(浓度4 mol/L)在1周内将24个实验水槽内的pH逐渐调至6.6±0.1(P1)、7.6±0.1(P2)、8.6±0.1(P3)和9.6±0.1(P4)。剩余6个水槽内不进行pH调节作为对照(P0)。待水槽内pH稳定后将对虾驯养1周。调节pH后水槽停止流水以免pH发生明显变化。

实验I时间为28 d。实验开始时将对虾从每个水槽内依次捕出, 分批称重, 随机放入与驯养水槽pH相同的水槽中(密度为50尾/水槽)。每个pH水平设6个重复。对虾初始体质量为(9.58±3.45) g(平均值±标准差, n=30)。实验期间, 每天06:00、12:00和18:00向各个水槽内投喂对虾配合饲料(投喂量相当于对虾体质量的4%), 投喂饲料后1 h(19:00)用虹吸方法清除水槽内的对虾残饵和粪便, 然后用预先调节pH的砂滤海水分别更换P1、P2、P3和P4水槽内约1/2的海水(新海水的pH分别为6.6、7.6、8.6和9.6), 用未经pH调节的砂滤海水更换P0水槽内的海水。每天06:00、09:00、12:00、15:00和18:00测定各个水槽内水温、DO和pH, 发现pH超出设计水平的±0.1则立即添加4 mol/L的HCl或4 mol/L的NaOH调至设计水平。每天用抄网检查实验水槽底部对虾的死亡情况, 发现死虾随时记录并测量死虾的体长和体质量。实验I期间水槽内24 h连续充气, 水温为(28.1±1.8)°C, 盐度为30±1。

实验开始当天(0 d)及之后的第7、14、21和28天, 从每个水槽内随机捕捞4尾对虾, 用1 mL

无菌注射器分别从虾头胸连接处的腹侧抽取两份血淋巴样品。1份血淋巴样品(0.5 mL)用于分析各种酶的活性(注射器内预先加入0.5 mL抗凝剂,抗凝剂成分:柠檬酸钠 7.949 g/L,氯化钠 19.6 g/L,葡萄糖 22.8 g/L,EDTA-Na<sub>2</sub> 3.3 g/L),另1份血淋巴样品(0.5 mL)用于血细胞计数(注射器内预先加入0.5 mL甲醛溶液)。用于分析酶活性的血淋巴取样后转入1.5 mL灭菌离心管并立即保存在液氮中;用于血细胞计数的血淋巴取样后转入1.5 mL灭菌离心管并立即保存在加有碎冰的保温箱内。血淋巴取样后,在每个实验水槽中心水面下30 cm处采集100 mL水样。所取的样品当天运回位于浙江大学舟山校区的实验室,保存在液氮(分析酶活性的血淋巴样品)或4℃冰箱(用于计数血细胞的血淋巴样品和水样)中。在取样后的3 d内完成有关水化学指标(总碱度、TAN、NO<sub>2</sub>-N、NO<sub>3</sub>-N、COD<sub>Mn</sub>)和Chl. *a*的分析。

**实验 II 不同 pH 昼夜变化幅度下凡纳滨对虾成活率、血淋巴谷胱甘肽含量和抗氧化酶活性的测定。**

实验 II 时间为 5 d。实验前从温室池塘内捕捞并挑选出 1 200 尾健康的对虾,在 30 个实验水槽中暂养 1 周(对虾密度为 40 尾/水槽),每天 06:00、12:00 和 18:00 投喂对虾配合饲料。实验开始时将暂养的对虾捕出,分批称重后随机放入 24 个实验水槽中(对虾密度为 20 尾/水槽),每个 pH 昼夜变化幅度设 6 个重复。对虾初始体质量为(8.43±4.60) g(平均值±标准差, n=24)。实验期间,每天上午(06:00~09:00)通过添加 4 mol/L 的 HCl 或 4 mol/L 的 NaOH 分别将 PV1、PV2 和 PV3 水槽内的 pH 调至 7.5,傍晚(15:00)将 PV1、PV2 和 PV3 水槽内的 pH 分别调至 8.2、9.5 和 10.0。实验 II 中对虾饲料投喂、充气和监测水温、DO 与 pH 的方法与实验 I 相同,但实验水槽不换水、不清除对虾残饵和粪便。实验 II 期间水温为(27.2±2.9)℃,盐度为 30±1,DO 为(6.96±1.67) mg/L。

实验开始和结束时分别从每个实验水槽内随机捕捞 10 尾对虾,采取血淋巴样品用于分析谷胱甘肽含量和抗氧化酶活性。在每个实验水槽中取 100 mL 水样。对虾血淋巴和水样的采取和保存方法同实验 I。

#### 1.4 样品分析

实验 I 中测定对虾血淋巴超氧化物歧化酶

(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽还原酶(GR)、酚氧化酶(PO)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)活性,计数血淋巴总细胞数、透明细胞数、半颗粒细胞数和颗粒细胞数,测定实验水槽内的总碱度、氨态氮(TAN)、亚硝态氮(NO<sub>2</sub>-N)、硝酸态氮(NO<sub>3</sub>-N)、化学耗氧量(COD<sub>Mn</sub>)和Chl. *a*含量。实验 II 中测定对虾血淋巴总谷胱甘肽(T-GSH)、氧化型谷胱甘肽(GSSG)和还原型谷胱甘肽(GSH)含量,测定血淋巴 SOD、GSH-Px、CAT 和 GR 活性,测定实验水槽内的总碱度、TAN、NO<sub>2</sub>-N、NO<sub>3</sub>-N、COD<sub>Mn</sub>和Chl. *a*含量。

将对虾血淋巴在 4℃下离心(3 000 r/min)10 min 后取血浆,利用试剂盒方法(南京建成生物工程研究所,中国)测定 SOD、CAT、GSH-Px、GR、PO 和 iNOS 活性以及 T-GSH、GSSG 和 GSH 含量。在 Nikon 80i 显微镜(10×40)下用血球计数板计数血淋巴总细胞数、透明细胞数、半颗粒细胞数和颗粒细胞数。实验水槽内的 pH 用 Mettler-Toledo EF30 型 pH 计(Mettler-Toledo, Switzerland)测定;水温和溶解氧(DO)用 YSI 58 溶氧仪(Yellow Spring Inc., USA)测定;TAN、NO<sub>2</sub>-N 和 NO<sub>3</sub>-N 用 SKALAR San<sup>++</sup>连续流动分析仪(Skalar Analytical, Netherlands)测定;总碱度<sup>[7]</sup>和 COD<sub>Mn</sub><sup>[8]</sup>按照相关监测规范方法测定。用 Turner 10-005 型荧光计(Turner Designs Inc., USA)测定水样荧光值,根据 Chl. *a* 浓度(μg/L)与荧光值(*x*)回归方程(Chl. *a*=114.00*x*-1.5245, R<sup>2</sup>=0.999)计算 Chl. *a* 浓度。

#### 1.5 数据分析

根据下列公式计算 SOD、CAT、GSH-Px、GR 和 iNOS 活性:

$$\begin{aligned} \text{SOD 活性 (U/mL)} &= \\ D_T \times D_0 \times [(A_C - A_{C_0}) - (A_T - A_{T_0})] / 50\% / (A_C - A_{C_0}) \\ \text{GSH-Px 活性} &= \\ [(OD_1 - OD_2) / (OD_5 - OD_0)] \times C_S \times D_T \times D_0 \\ \text{CAT 活性 (U/mL)} &= \\ (OD_C - OD_T) \times 271 \times (1/60 \times V) \times D_0 \\ \text{GR 活性 (U/L)} &= \\ [(A_{t=30s} - A_{t=2.5min}) / (6.22 \times R)] / V / T \times 1\ 000 \\ \text{iNOS 活性 (U/mL)} &= [(OD_{iNOST} - OD_{iNOS0}) / 38.3 \times \\ 10^{-6}] \times [(2.51 + V) / V] \times [1 / (R \times T)] / 1\ 000 \end{aligned}$$

式中,  $D_T$  和  $D_0$  分别为样品测试和测试前反应体系的稀释倍数;  $V$ (mL) 为样品体积;  $R$ (cm) 为比色皿光程;  $T$ (min) 为反应时间;  $A_C$ 、 $A_{C_0}$ 、 $A_T$  和

$A_{70}$  分别为 450 nm 波长下对照、对照空白、样品和样品空白的吸光度;  $OD_1$ 、 $OD_2$ 、 $OD_5$  和  $OD_0$  分别为 412 nm 波长下非酶管、酶管、标准管和空白管的吸光度;  $C_S$  为标准管的 GSH 浓度;  $OD_C$  和  $OD_T$  分别为 405 nm 波长下对照管和样品管的吸光度;  $A_{t=30s}$  和  $A_{t=2.5min}$  分别为 340 nm 波长下样品管反应 30 s 和 2 min 时的吸光度;  $OD_{iNOST}$  和  $OD_{iNOS0}$  分别为 530 nm 波长下样品管和空白管的吸光度。

采用单因素方差分析 (ANOVA) 分别检验不同 pH 水平或昼夜变化幅度下凡纳滨对虾成活率、血淋巴谷胱甘肽 (T-GSH、GSSG 和 GSH) 含量、血淋巴抗氧化酶 (SOD、CAT、GSH-Px、GR) 活性和代谢酶 (PO 和 iNOS) 活性以及血淋巴细胞数 (总细胞数、透明细胞数、半颗粒细胞数和颗粒细胞数) 的差异。当差异显著时进一步用 Duncan 氏方法比较各处理之间的差异。用斯皮尔曼相关分析 (SCA) 分别检验不同 pH 水平和昼夜变化幅度下对虾成活率与各项生理指标间的

关系。所有数据分析前先经过  $\lg(x+1)$  转换。利用 R 软件 (版本 3.4.2) 中的 Corrplot 数据包完成 SCA, 利用 SPSS 软件 (版本 12.00) 完成 ANOVA 和 Duncan 氏检验, 利用 GraphPad Prism (版本 7.0) 绘图。取  $P < 0.05$  为差异显著性水平。

## 2 结果

### 2.1 不同 pH 值下凡纳滨对虾成活率、血淋巴细胞计数以及抗氧化酶和代谢酶活性

实验 I 期间 P0、P1、P2、P3 和 P4 水槽内对虾成活率分别为  $84\% \pm 3\%$ 、 $79\% \pm 4\%$ 、 $77\% \pm 4\%$ 、 $81\% \pm 9\%$  和  $31\% \pm 2\%$ , 不同 pH 水平下对虾成活率存在显著差异 (ANOVA,  $P < 0.05$ )。P4 水槽内对虾成活率显著低于 P0、P1、P2 和 P3 水槽 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ ); P0 水槽内对虾成活率显著高于 P1 和 P2 水槽 (Duncan,  $P < 0.05$ ), 但与 P3 水槽无显著差异 (Duncan 氏,  $P > 0.05$ )。从图 1 可见, 在所检验的 pH 范围内 (6.6~9.6), 对虾成活率与

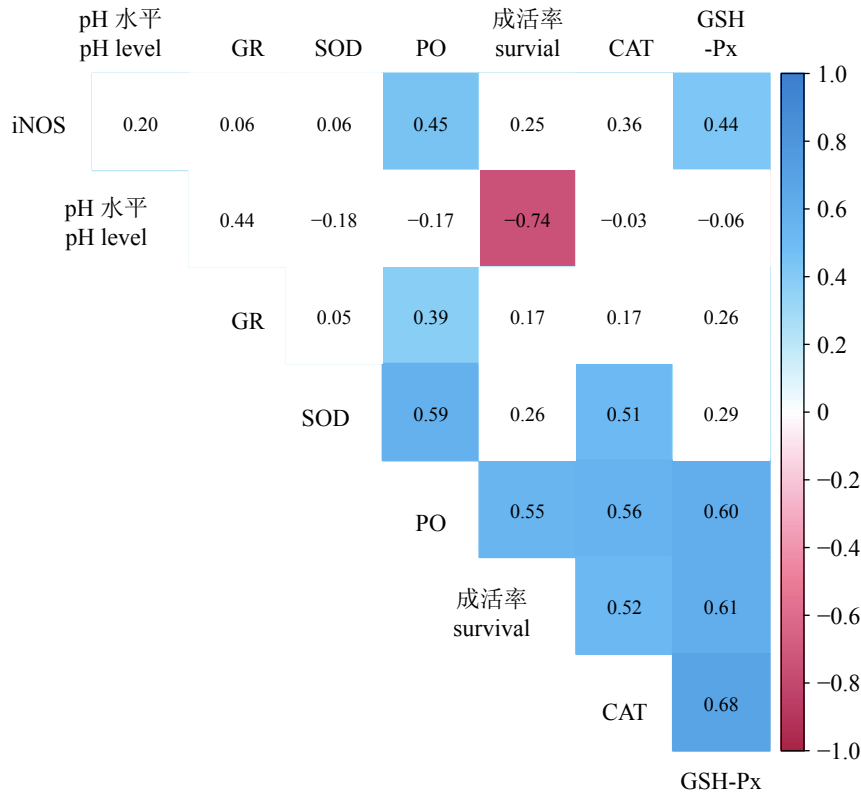


图 1 不同 pH 值下凡纳滨对虾成活率、抗氧化酶和代谢酶活性的关系

红色表示显著负相关, 蓝色表示显著正相关, 白色表示相关性不显著, 下同

Fig. 1 Correlation between survival of *L. vannamei*, activity of antioxidant enzymes and metabolism enzymes at different pH

The red color indicates negative correlation, the blue color indicates positive correlation, and the white color indicates no significant correlation, the same below

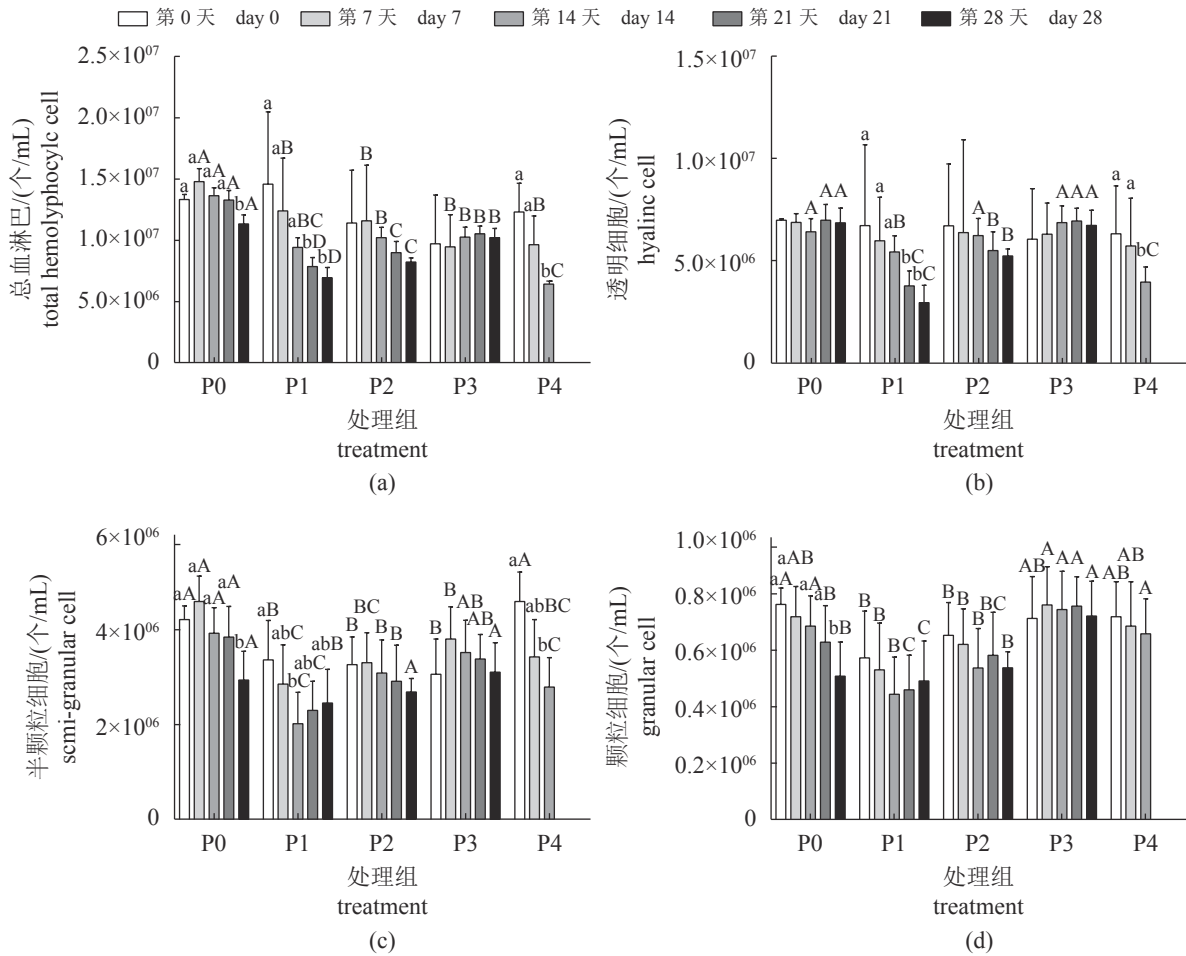


图 2 不同 pH 值下凡纳滨对虾血淋巴细胞数

P0. 对照; P1. pH 6.6; P2. pH 7.6; P3. pH 8.6; P4. pH 9.6。数据表示为平均值±标准差。字母表示 Duncan 氏检验结果, 小写字母表示同一处理组在不同采样时间的差异, 大写字母表示同一时间不同处理组的差异。字母不同表示存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), 下同

Fig. 2 Hemolymph cell count of *L. vannamei* at different pH levels

P0. Control; P1. pH 6.6; P2. pH 7.6; P3. pH 8.6; P4. pH 9.6. Data are expressed as mean ± SD. Letters indicate the results of Duncan's test. The small letters reflect the difference for the same treatment between different sampling days, and the capital letters reflect the difference between different treatments on the same sampling day. The data with different letters are significant different at  $P < 0.05$ , the same below

pH 水平呈显著负相关 (SCA,  $r = -0.74$ ,  $P < 0.05$ )。

pH 水平对血淋巴总细胞数、透明细胞数及半颗粒细胞数无显著影响 (ANOVA,  $P > 0.05$ ), 但显著影响颗粒细胞数 (ANOVA,  $P < 0.05$ )。P1 和 P2 水槽内对虾的颗粒细胞数明显少于 P0、P3 和 P4 水槽 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ )。从图 2 可见, 实验期间 P2 和 P3 水槽内对虾血淋巴总细胞数、透明细胞数、半颗粒细胞数和颗粒细胞数未随时间延长而发生显著变化 (ANOVA,  $P > 0.05$ ), 但 P0 水槽内对虾血淋巴总细胞数、半颗粒细胞数和颗粒细胞数在第 28 天明显减少 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ ), P1 水槽内对虾血淋巴总细胞数和透明细胞数在第 21 天明显减少 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ ),

P4 水槽内对虾血淋巴总细胞数和透明细胞数在第 14 天明显减少 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ )。与 P0 水槽相比, P1、P2、P3 和 P4 水槽内对虾血淋巴总细胞数从实验后的第 7 天起明显减少 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ ); P1 水槽内对虾血淋巴透明细胞数从第 14 天起明显减少 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ ), 半颗粒细胞数和颗粒细胞数在第 0、7、14、21 和 28 天时明显减少 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ ); P2 水槽内对虾血淋巴透明细胞数从第 21 天起明显减少 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ ), 半颗粒细胞数在第 0、7、14 和 21 天时明显减少 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ ); P3 水槽内对虾血淋巴半颗粒细胞数在第 0 和 7 天时明显减少 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ ), 颗粒细胞数在第 21

和28天时显著增加; P4水槽内对虾血淋巴透明细胞数从第14天起明显减少 (Duncan氏,  $P < 0.05$ ), 半颗粒细胞数在第7和14天时明显减少 (Duncan氏,  $P < 0.05$ )。

对虾成活率分别与GSH-Px、CAT和PO活性呈显著正相关 (SCA,  $P < 0.05$ ), 但对虾血淋巴SOD、CAT、GSH-Px、GR、PO和iNOS活性与pH水平不相关 (SCA,  $P > 0.05$ )。pH水平可显

著影响对虾血淋巴SOD、GSH-Px、CAT、GR、PO和iNOS活性 (ANOVA,  $P < 0.05$ ) (图3)。P3水槽内对虾血淋巴SOD活性显著高于P1、P2和P4水槽 (Duncan氏,  $P < 0.05$ ); P2水槽SOD活性显著高于P1水槽 (Duncan氏,  $P < 0.05$ ); P1水槽SOD活性显著高于P4水槽 (Duncan氏,  $P < 0.05$ )。P3水槽内对虾血淋巴GSH-Px活性显著高于P0、P1、P2和P4水槽 (Duncan氏,  $P < 0.05$ )。

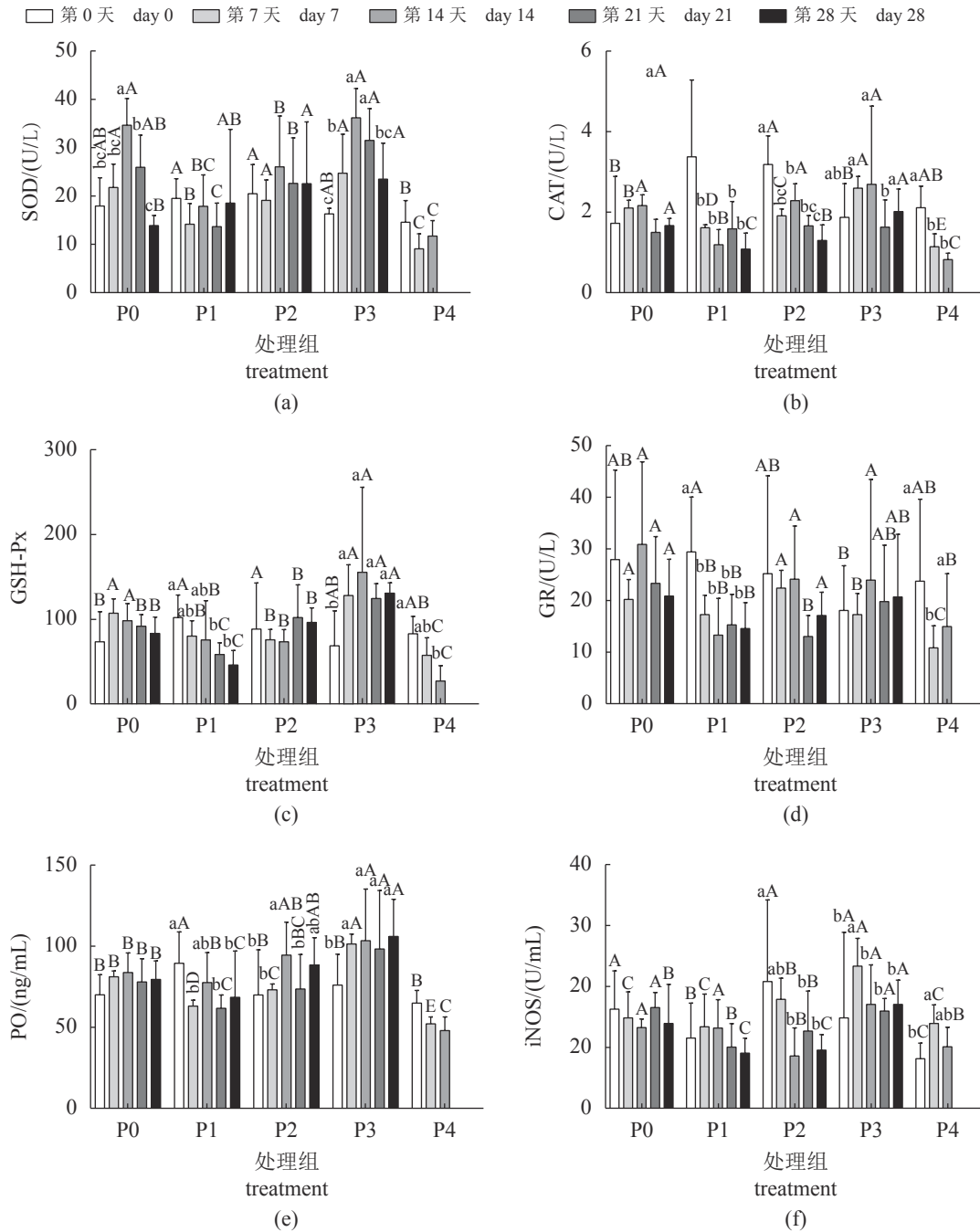


图3 不同pH值下凡纳滨对虾抗氧化酶和代谢酶活性

Fig. 3 Activity of antioxidant enzymes and metabolism enzymes of *L. vannamei* at different pH levels

P0 水槽内对虾血淋巴 GR 活性显著高于 P1 和 P4 水槽 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ )。P2 和 P3 水槽内对虾血淋巴 CAT 活性显著高于 P4 水槽 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ )。P3 水槽内对虾血淋巴 PO 活性显著高于 P0、P1、P2 水槽, 而 P0、P1 和 P2 水槽 PO 活性显著高于 P4 水槽 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ )。P3 水槽内对虾血淋巴 iNOS 活性显著高于 P0 和 P2 水槽, P0 和 P2 水槽 iNOS 活性显著高于 P1 和 P4 水槽 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ )。从图 3 可见, 对虾血淋巴 SOD、GSH-Px、CAT、GR、PO 和 iNOS 活性随时间而变化 (ANOVA,  $P < 0.05$ )。P0 水槽内对虾血淋巴中 SOD 活性在实验后的第 14 天达到最大值, 之后降低 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ ); P1 水槽内对虾血淋巴中的 CAT、GR 和 PO 活性在第 7 天显著降低, GSH-Px 活性在第 14 天显著降低 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ ); P2 水槽 CAT 活性在第 7 天显著降低, iNOS 活性在第 14 天显著降低 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ ); P3 水槽 SOD、CAT、GSH-Px、GR 活性在第 14 天达到最大值, 随后降低 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ ), iNOS 和 PO 活性在第 7 天显著增加 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ ); P4 水槽 CAT 活性在第 7 天显著降低, GSH-Px 活性在第 14 天显著降低, iNOS 活性在第 7 天达到最大值, 随后降低 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ )。与 P0 水槽相比, P1 水槽从第 7 天起 SOD、CAT 和 PO 活性显著降低, 第 7 和 14 天时 GSH-Px 活性显著降低, 第 14 天起 GR 活性显著降低 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ ); P2 水槽第 28 天起 SOD 活性显著增加, 第 7 天起 CAT 和 PO 活性显著降低, 第 7 和 14 天时 GSH-Px 显著降低 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ ); P3 水槽第 28 天起 SOD 活性显著增加, 第 7 天起 CAT 和 PO 活性显著增加 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ ); P4 水槽第 7 天起 SOD、CAT、GR 和 PO 活性显著降低, 第 7 和 14 天时 GSH-Px 活性显著降低 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ )。

## 2.2 不同 pH 昼夜变化幅度下凡纳滨对虾成活率、血淋巴谷胱甘肽含量与抗氧化酶活性

实验 II 期间 PV0、PV1、PV2 和 PV3 水槽内对虾成活率分别为  $78\% \pm 4\%$ 、 $80\% \pm 11\%$ 、 $47\% \pm 20\%$  和  $2\% \pm 3\%$ , pH 昼夜变化幅度增加可显著降低对虾成活率 (ANOVA,  $P < 0.05$ )。PV0 和 PV1 水槽内对虾成活率显著高于 PV2 和 PV3 水槽 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ )。从图 4 可见, 对虾成活率与 pH 昼夜变化幅度呈显著负相关 (SCA,  $r = -0.86$ ,

$P < 0.05$ )。

对虾血淋巴 T-GSH、GSH 和 GSSG 含量与 pH 昼夜变化幅度相关性不显著 (SCA,  $P > 0.05$ ), 但 SOD、GSH-Px、GR 和 CAT 活性与 pH 昼夜变化幅度呈显著负相关 (SCA,  $P < 0.05$ )。对虾成活率与 CAT 活性呈显著正相关 (SCA,  $P < 0.05$ ), 但与 T-GSH、GSH 和 GSSG 含量以及 SOD、GSH-Px 和 GR 活性均不相关 (SCA,  $P > 0.05$ )。GSH、GSSG 和 T-GSH 含量与 GSH-Px 和 GR 活性不相关 (SCA,  $P > 0.05$ ) (图 4)。pH 昼夜变化幅度对 T-GSH、GSSG 和 GSH 含量无显著影响 (ANOVA,  $P > 0.05$ ), 但可显著影响 SOD、GSH-Px、GR 和 CAT 活性 (ANOVA,  $P < 0.05$ ) (表 1)。PV1 水槽内对虾血淋巴 SOD 和 GR 活性显著高于 PV2 和 PV3 水槽 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ ), GSH-Px 活性显著高于 PV2 和 PV3 水槽 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ ), CAT 活性显著高于 PV3 水槽 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ )。与 PV0 水槽相比, PV1 水槽内对虾血淋巴 SOD 和 GR 活性高于后者, GSH-Px 和 CAT 活性与后者无显著差异 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ )。PV2 和 PV3 水槽内对虾血淋巴 GSH-Px 和 CAT 活性均低于 PV0 水槽 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ ), 同时其 SOD、GSH-Px 和 GR 活性均低于 PV1 水槽 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ )。

## 2.3 不同 pH 值和昼夜变化幅度对水质的影响

实验 I 中, 不同 pH 值下实验水槽内总碱度、TAN、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{COD}_{\text{Mn}}$  或 Chl. *a* 存在显著差异 (ANOVA,  $P < 0.05$ ), 但  $\text{NO}_3\text{-N}$  差异不显著 (ANOVA,  $P > 0.05$ )。从图 5 可见, TAN、 $\text{NO}_2\text{-N}$  和  $\text{NO}_3\text{-N}$  在实验开始后的第 7 天显著增加, Chl. *a* 在第 14 天显著增加 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ )。与 P0 水槽相比, P1 水槽内 TAN 从第 7 天起显著降低,  $\text{COD}_{\text{Mn}}$  显著增加; 总碱度和  $\text{NO}_2\text{-N}$  从第 21 天起显著降低; Chl. *a* 在第 14 天时显著降低, 第 21 和 28 天时显著增加 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ )。P2 水槽内 TAN 从第 14 天起显著增加; 总碱度从第 21 天起显著增加; Chl. *a* 从第 14 天起显著降低;  $\text{NO}_2\text{-N}$  第 14 和 21 天时显著降低 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ )。P3 水槽内总碱度第 0 天起显著增加; TAN 和  $\text{COD}_{\text{Mn}}$  第 7 天时显著降低;  $\text{NO}_2\text{-N}$  第 14 天时显著降低, 第 28 天时显著增加; Chl. *a* 从第 21 天起显著增加 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ )。P4 水槽内总碱度在第 0、7 和 14 天时显著增加; TAN 和  $\text{NO}_2\text{-N}$  在第 7 天时显著降低;  $\text{NO}_3\text{-N}$  在第 14 天时显著增加 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ )。

实验 II 中, 不同 pH 昼夜变化幅度显著影响

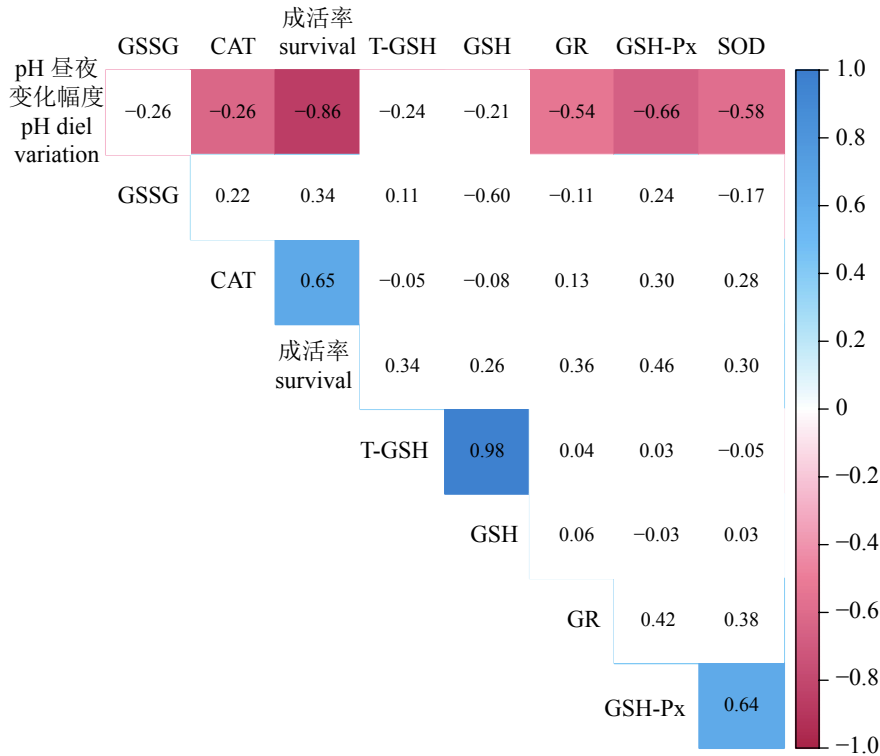


图 4 不同 pH 昼夜变化幅度下凡纳滨对虾成活率、谷胱甘肽含量与抗氧化酶活性的关系  
 Fig. 4 Correlation between survival of *L. vannamei*, glutathione content and activity of antioxidant enzymes at different amplitude of pH diel variation

表 1 不同 pH 昼夜变化幅度下凡纳滨对虾血淋巴中谷胱甘肽含量和抗氧化酶活性  
 Tab. 1 Glutathione content and activity of antioxidant enzymes of *L. vannamei* at different amplitude of pH diel variation

	PV0	PV1	PV2	PV3
总谷胱甘肽/(μmol/L) T-GSH	5.84±3.99	3.39±0.42	2.77±0.46	2.05±0.16
氧化型谷胱甘肽/(μmol/L) GSSG	0.75±0.21	0.94±0.88	0.78±0.33	0.38±0.00
还原型谷胱甘肽/(μmol/L) GSH	2.02±0.52	4.33±3.94	1.21±0.58	1.30±2.56
超氧化物歧化酶/(U/mL) SOD	3.98±1.45 <sup>b</sup>	8.52±4.42 <sup>a</sup>	3.75±1.44 <sup>b</sup>	2.06±0.62 <sup>b</sup>
谷胱甘肽过氧化物酶/(活力单位) GSH-Px	22.64±7.14 <sup>a</sup>	36.48±20.35 <sup>a</sup>	12.89±6.68 <sup>b</sup>	5.09±6.17 <sup>b</sup>
谷胱甘肽还原酶/(U/L) GR	13.67±7.38 <sup>b</sup>	33.49±23.64 <sup>a</sup>	10.45±3.35 <sup>b</sup>	6.43±6.82 <sup>b</sup>
过氧化氢酶/(U/mg Hb) CAT	1.98±1.00 <sup>a</sup>	2.43±0.39 <sup>a</sup>	1.86±0.49 <sup>a</sup>	0.18±0.13 <sup>b</sup>

注: PV0. 对照, pH 7.5~8.7; PV1. pH 7.5~8.2; PV2. pH 7.5~9.5; PV3. pH 7.5~10.0。数据表示为平均值±标准差。同行字母表示Duncan氏检验结果, 字母不同表示处理间存在显著差异( $P < 0.05$ ), 下同

Notes: PV0. control, pH 7.5-8.7; PV1. pH 7.5-8.2; PV2. pH 7.5-9.5; PV3. pH 7.5-10.0. Data are expressed as mean ± SD. Letters indicate the results of Duncan's test, the data with different letters in the same row are significantly different at  $P < 0.05$ , the same below

水体总碱度、TAN 和  $COD_{Mn}$ , 但对  $NO_2-N$ 、 $NO_3-N$  和 Chl. *a* 含量无显著影响 (ANOVA,  $P > 0.05$ , 表 2)。实验期间 PV1、PV2 和 PV3 水槽内总碱度显著高于 PV0 水槽 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ ); PV2 和 PV3 水槽内 TAN 显著低于 PV0 和 PV1 水槽 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ ); PV0、PV1 和 PV2 水槽内  $COD_{Mn}$  显著高于 PV3 水槽 (Duncan 氏,  $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 pH 值对凡纳滨对虾存活率、血淋巴细胞数、血淋巴中抗氧化酶活性和代谢酶活性的影响

李云梦等<sup>[6]</sup>推测 pH 过高可能是导致 2016 年绍兴市部分滩涂围垦池塘内凡纳滨对虾大量死亡的重要原因。本实验 I 结果显示 P4 水槽内 (pH 9.6)



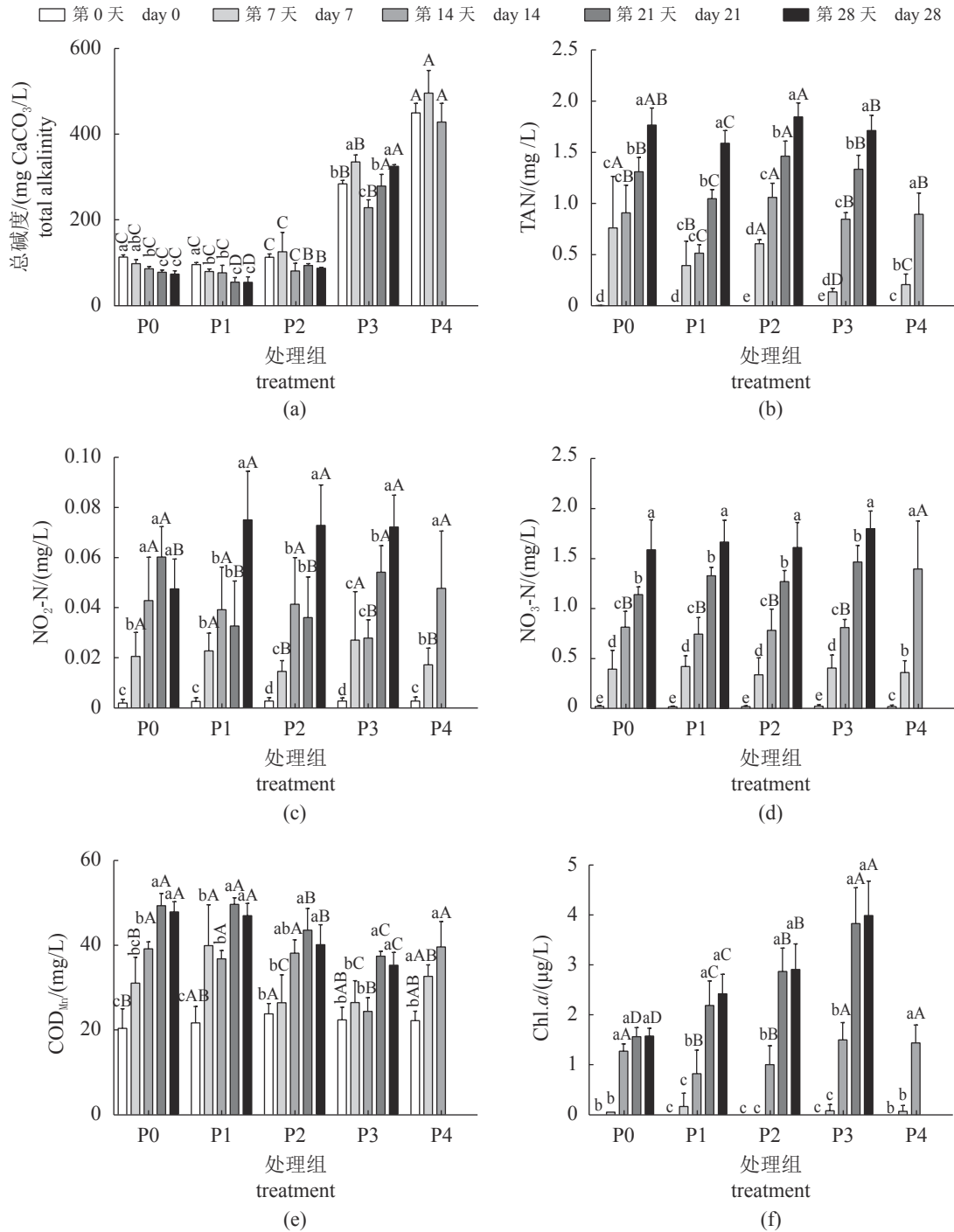


图 5 不同 pH 值下水化学因子的变化

Fig. 5 Variation in chemical water quality at different pH levels

对虾平均成活率远远低于 P1、P2 和 P3 水槽 (pH 6.6~8.6), 表明环境 pH 达到 9.6 可导致凡纳滨对虾大量死亡, 这一结果在一定程度上证实了李云梦等<sup>[6]</sup>关于 pH 过高可能导致凡纳滨对虾大量死亡的猜测。P1 和 P2 水槽内 (pH 6.6~7.6) 对虾成活率略低于 P0 和 P3 水槽 (pH 8.2~8.6), 表明环境 pH 值过低也不利于凡纳滨对虾生活。

甲壳动物血淋巴透明细胞具有吞噬作用, 而颗粒细胞和半颗粒细胞具有包裹和凝集的作用<sup>[9-10]</sup>。处于应激状态时, 甲壳动物血淋巴细胞数往往发生变化<sup>[11]</sup>。当环境 pH 过高 (pH 10.1) 或过低 (pH 6.5) 时凡纳滨对虾血淋巴总细胞数、透明细胞及颗粒细胞数均明显降低<sup>[1]</sup>。相比之下, 当环境 pH > 8 时, 凡纳滨对虾血淋巴总细胞数、

表 2 不同 pH 昼夜变化幅度下水化学因子的变化

Tab. 2 Variation in chemical water quality at different amplitude of pH diel variation

	PV0	PV1	PV2	PV3
总碱度/(mg CaCO <sub>3</sub> /L) total alkalinity	170.83±19.03 <sup>c</sup>	131.77±27.56 <sup>b</sup>	400.78±39.72 <sup>a</sup>	445.31±37.56 <sup>a</sup>
氨态氮/(mg/L) TAN	1.89±0.17 <sup>a</sup>	1.98±0.15 <sup>a</sup>	1.71±0.18 <sup>b</sup>	1.30±0.37 <sup>c</sup>
亚硝酸态氮/(mg/L) NO <sub>2</sub> -N	0.04±0.03	0.10±0.11	0.07±0.06	0.04±0.04
硝酸态氮/(mg/L) NO <sub>3</sub> -N	0.30±0.12	0.74±0.65	0.59±0.39	0.35±0.21
化学耗氧量/(mg/L) COD <sub>Mn</sub>	16.99±1.07 <sup>a</sup>	16.72±0.51 <sup>a</sup>	16.12±0.60 <sup>a</sup>	3.86±0.43 <sup>b</sup>
叶绿素 $a$ /( $\mu$ g/L) Chl. $a$	64.21±12.25	63.21±17.67	45.48±18.26	35.99±27.55

透明细胞数和颗粒细胞数均明显多于其在 pH < 7 时<sup>[12-13]</sup>。本实验 I 中, P1(pH 6.6) 和 P4(pH 9.6) 水槽内对虾血淋巴透明细胞数、半颗粒细胞数和颗粒细胞数随时间延长而显著减少, 但 P0、P2 和 P3 水槽内对虾上述各类血淋巴细胞数未发生明显改变 (P0 水槽内对虾血淋巴半颗粒细胞数和颗粒细胞数仅在实验结束时明显减少), 表明环境 pH 过高 ( $\geq 9.6$ ) 或过低 ( $\leq 6.6$ ) 会导致凡纳滨对虾血淋巴透明细胞数、半颗粒细胞数和颗粒细胞数减少。P4 水槽内对虾血淋巴透明细胞数和总细胞数在第 14 天明显减少, 而 P1 水槽内对虾血淋巴透明细胞数和总细胞数在第 21 天明显减少, 表明高 pH 对凡纳滨对虾血淋巴透明细胞数的影响可能较低 pH 更甚。实验结束时所有处理组各类血淋巴细胞数均较实验开始时呈现出不同程度的减少, 初步推测这一现象与实验期间养殖系统内 TAN、NO<sub>2</sub>-N 和有机质等养殖废物积累所导致的凡纳滨对虾应激有关。Moulac 等<sup>[14]</sup> 和 Liu 等<sup>[15]</sup> 报道水温、盐度、溶解氧以及氮含量等环境因子变化可影响凡纳滨对虾和细角滨对虾 (*Litopenaeus stylirostris*) 血淋巴细胞数量。

甲壳动物颗粒细胞和半颗粒细胞中存在酚氧化酶原 (proPO)<sup>[16]</sup>, 当受到胁迫时, proPO 可转化为 PO 并发挥免疫功能<sup>[17]</sup>。对虾血淋巴细胞数与 PO 活性相关<sup>[18]</sup>。生物受到损伤时表达 iNOS, 其进一步催化产生对病毒、细菌、真菌和寄生虫等病原体具有杀灭作用的 NO<sup>[19]</sup>。中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 患白斑综合征 (WSSV) 后, 其体内 iNOS 活性降低<sup>[20]</sup>。本实验 I 中, 凡纳滨对虾血淋巴颗粒细胞数或半颗粒细胞数与 PO 活性相关性不显著, 但 PO 活性与对虾成活率以及血淋巴 SOD、GSH-Px、GR、CAT 和 iNOS

活性呈显著正相关, 表明这一指标可能与凡纳滨对虾存活率和氧化应激状态存在密切的关系。与 PO 相比, 血淋巴 iNOS 活性仅与 PO 和 GSH-Px 活性呈正相关, 而与对虾成活率以及 SOD、GR 和 CAT 活性不相关, 表明这一指标对凡纳滨对虾存活状态的指示作用弱于 PO 活性。

甲壳动物体内的 SOD、CAT、GSH-Px 和 GR 等抗氧化酶可减轻各种氧自由基 (ROS) 所诱导的氧化应激损伤, 其中, SOD 可将超氧自由基 (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) 转化为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 而 GSH-Px 和 CAT 进一步将 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 转化为 H<sub>2</sub>O<sup>[21]</sup>。本实验 I 中, 不同 pH 值下凡纳滨对虾成活率与血淋巴中的 PO、GSH-Px 和 CAT 活性呈显著正相关, 表明 PO、GSH-Px 和 CAT 活性升高对凡纳滨对虾可产生保护作用, 降低其死亡率。甲壳动物体内 SOD、CAT、GSH-Px 和 GR 等抗氧化酶活性和免疫功能与环境间存在密切的关系。环境 pH 过高或过低时中国明对虾体内总抗氧化能力 (T-AOC)、SOD 和 CAT 活性降低<sup>[22]</sup>。罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 在受到氨氮胁迫时其体内的 SOD 和 PO 活性下降<sup>[23]</sup>。Li 等<sup>[1]</sup> 报道当水体 pH 为 6.5 和 10.5 时, 凡纳滨对虾体内 SOD 活性在 6~24 h 内显著下降, 并且高 pH 下对虾体内与免疫相关的酶的活性急剧下降, 死亡率大幅升高。本实验 I 中, P4 水槽 (pH 9.6) 内凡纳滨对虾血淋巴 SOD、GSH-Px 和 CAT 活性表现为先升高, 随后逐渐下降的趋势 (第 14 天 SOD 活性高于第 7 天)。这一结果与有关生物体受到胁迫后其体内抗氧化酶活性增加的观点一致<sup>[23]</sup>。

### 3.2 pH 昼夜变化幅度对凡纳滨对虾存活率、血淋巴谷胱甘肽含量和抗氧化酶活性的影响

实验 II 结果表明, pH 昼夜变化幅度可影响

凡纳滨对虾成活率。PV2(pH 7.5~9.5)和PV3(pH=7.5~10.0)水槽内对虾成活率明显低于PV0(pH 7.5~8.7)和PV1(pH 7.5~8.2)水槽,表明一天中最高pH达到9.5即可导致对虾成活率明显下降,这与实验I的结果一致。PV2和PV3水槽内对虾血淋巴GSH-Px活性显著低于PV0和PV1水槽,其CAT活性显著低于PV0水槽;PV3水槽内对虾血淋巴CAT活性显著低于PV1水槽。这些结果表明,当pH昼夜变化幅度达到2.0~2.5时,可导致对虾血淋巴GSH-Px和CAT活性下降。考虑到PV3水槽内对虾成活率较低的事实,初步推测对虾死亡率升高在一定程度上与血淋巴GSH-Px和CAT活性较低有关。研究表明环境pH变化可影响凡纳滨对虾肝胰腺中SOD、GSH-Px和CAT基因表达<sup>[24]</sup>,而pH波动会使对虾体内产生大量自由基并导致DNA损伤<sup>[25-28]</sup>。此外,尽管PV0、PV1、PV2和PV3水槽间对虾血淋巴GSH-Px和GR活性存在显著差异,但不同水槽间对虾血淋巴T-GSH、GSSG和GSH含量无显著差异,并且GSH、GSSH和T-GSH含量与GSH-Px或GR活性不相关。这些结果表明血淋巴GSH-Px和GR活性的变化可能只是改变GSSG与GSH之间的转换速率。本实验II中,凡纳滨对虾成活率与其血淋巴CAT活性呈正相关,与血淋巴T-GSH、GSH和GSSG含量以及SOD、GSH-Px和GR活性不相关。实验I中,凡纳滨对虾成活率与血淋巴GSH-Px和CAT活性呈正相关,与SOD和GR活性不相关。这些结果表明,不同pH值和变化幅度下凡纳滨对虾成活率与体内血淋巴GSH-Px和CAT活性存在一定的联系,即当环境pH水平较高( $\geq 9.6$ )或变化幅度较大( $\geq 2.0$ )时,对虾成活率、血淋巴GSH-Px和CAT活性均相对较低。这一现象是否表明对虾成活率与其血淋巴GSH-Px和CAT活性存在因果关系尚不能定论,值得进一步研究。

### 3.3 不同pH值和昼夜变化幅度对凡纳滨对虾养殖环境的影响

水体pH变化在很大程度上取决于水中碳酸盐体系( $\text{CO}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{CO}_3^{2-}$ )<sup>[2]</sup>。浮游植物光合作用和水生生物呼吸作用均可改变水体 $\text{CO}_2$ 浓度,前者消耗 $\text{CO}_2$ ,使pH升高;后者产生 $\text{CO}_2$ ,使pH降低。此外,对虾活动、降雨、溶解性有机质积累等都可对养虾池塘水体的pH产生影响<sup>[29-30]</sup>。pH变化可影响水体微生物代谢,进一步引起TAN

和 $\text{NO}_2\text{-N}$ 含量的变化<sup>[31]</sup>。例如,细菌*Nitrosomonas*和*Nitrobacter*适宜生长的pH范围为7.0~9.0<sup>[32-33]</sup>。其中硝化细菌*Nitrosomonas eutropha*和*N. europaea*的最适pH为7.4~7.8<sup>[34]</sup>。氨氧化细菌(*Nitrosomonas* sp.、*Nitrospira* sp.、*Nitrobacter* sp.和*Nitrospira genera*)的氨氧化速率在pH为8.0时最高,当pH降低到7.0时氨氧化速率下降<sup>[35]</sup>。李云梦等<sup>[6]</sup>和张瑜斌等<sup>[36]</sup>报道对虾养殖池塘中pH与TAN和 $\text{NO}_2\text{-N}$ 呈负相关。本实验I中,P0、P1、P2、P3和P4水槽内TAN、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{COD}_{\text{Mn}}$ 和Chl. *a*浓度随对虾养殖时间延长而升高,且不同pH下总碱度、TAN、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{COD}_{\text{Mn}}$ 和Chl. *a*存在显著差异。实验II中,不同pH昼夜变化幅度显著影响水体总碱度、TAN和 $\text{COD}_{\text{Mn}}$ 。考虑到实验I期间所有水槽内TAN浓度( $< 2.0$  mg/L)始终低于对虾养殖池塘中的TAN浓度<sup>[3,5]</sup>, $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度( $< 1.0$  mg/L)远远低于 $\text{NO}_2\text{-N}$ 产生毒害作用时的浓度(25.7 mg/L)<sup>[36]</sup>;实验II期间对虾成活率较低的水槽(PV3)内TAN和 $\text{COD}_{\text{Mn}}$ 明显低于成活率相对较高的水槽(PV0和PV1),初步认为增加pH昼夜变化幅度所导致的养殖环境变化可能不是造成对虾成活率下降的主要原因。

### 3.4 结论

环境pH水平和昼夜变化幅度可显著影响池塘养殖凡纳滨对虾成活率。当 $\text{pH} \geq 9.5$ 或昼夜pH最高值超过9.5时,对虾死亡率显著增加,同时伴随对虾血淋巴SOD、GSH-Px、CAT和PO活性的变化。这一现象表明高pH胁迫的确是导致池塘养殖凡纳滨对虾死亡的重要原因。因此,建议将调控pH作为凡纳滨对虾池塘养殖环境管理的一项措施。

### 参考文献:

- [1] 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 & Shellfish Immunology*, 2008, 25(6): 701-709.
- [2] Boyd C E. *Water quality in ponds for aquaculture*[M]. Birmingham, AL, USA: Birmingham Publishing, 1990.
- [3] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2019年中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2019: 17-22.

- Fisheries and Fisheries Administration Bureau of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China Fisheries Statistical Yearbook 2019[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2019: 17-22(in Chinese).
- [4] Furtado P S, Poersch L H, Wasielesky Jr W. Effect of calcium hydroxide, carbonate and sodium bicarbonate on water quality and zootechnical performance of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in bio-flocs technology (BFT) systems[J]. *Aquaculture*, 2011, 321(1-2): 130-135.
- [5] Zhang K Q, Pan L Q, Chen W B, *et al.* Effect of using sodium bicarbonate to adjust the pH to different levels on water quality, the growth and the immune response of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in zero-water exchange biofloc-based culture tanks[J]. *Aquaculture Research*, 2017, 48(3): 1194-1208.
- [6] 李云梦, 郑侠飞, 王岩, 等. 绍兴市凡纳滨对虾围垦滩涂养殖池塘的理化环境和浮游植物[J]. *渔业现代化*, 2017, 44(6): 1-8.
- Li Y M, Zheng X F, Wang Y, *et al.* Physicochemical environment and phytoplankton in *Litopenarus vannamei* ponds located in the diked tidal flat in Shaoxing city[J]. *Fishery Modernization*, 2017, 44(6): 1-8(in Chinese).
- [7] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法. 第4版 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 117-118.
- State Environmental Protection Administration. Water and wastewater monitoring and analysis methods. 4th ed[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 2002: 117-118(in Chinese).
- [8] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 海洋监测规范第4部分: 海水分析: GB 17378.4-2007[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007: 101-103.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. The specification for marine monitoring-Part 4: Seawater analysis: GB 17378.4-2007[S]. Beijing: Standards Press of China, 2007: 101-103(in Chinese).
- [9] Tsing A, Arcier J M, Brehelin M. Hemocytes of penaeid and palaemonid shrimps: morphology, cytochemistry, and hemograms[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1989, 53(1): 64-77.
- [10] Kitikiew S, Chen J C, Putra D F, *et al.* Fucoidan effectively provokes the innate immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against experimental *Vibrio alginolyticus* infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(1): 280-290.
- [11] Yang C C, Lu C L, Chen S, *et al.* Immune gene expression for diverse haemocytes derived from pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 44(1): 265-271.
- [12] Chen Y Y, Chen J C, Tseng K C, *et al.* Activation of immunity, immune response, antioxidant ability, and resistance against *Vibrio alginolyticus* in white shrimp *Litopenaeus vannamei* decrease under long-term culture at low pH[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 46(2): 192-199.
- [13] Pan L Q, Jiang L X, Miao J J. Effects of salinity and pH on immune parameters of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2005, 24(4): 1223-1227.
- [14] Moullac L G, Soyeux C, Saulnier D, *et al.* Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1998, 8(8): 621-629.
- [15] Liu C H, Chen J C. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2004, 16(3): 321-334.
- [16] Gollas-Galván T, Hernández-López J, Vargas-Albores F. Prophenoloxidase from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) hemocytes[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, 122(1): 77-82.
- [17] Söderhäll K, Aspán A, Duvic B. The pro-PO-system and associated proteins; role in cellular communication in arthropods[J]. *Research in Immunology*, 1990, 141(9): 896-907.
- [18] Cheng W, Chen J C. The virulence of *Enterococcus* to freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its immune resistance under ammonia stress[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2002, 12(2): 97-109.
- [19] Bogdan C. Nitric oxide and the immune response[J]. *Nature Immunology*, 2001, 2(10): 907-916.

- [20] 姜国建, 于仁诚, 王云峰, 等. 中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)血细胞中一氧化氮合成酶的鉴定及其在白斑综合症病毒感染过程中的变化[J]. *海洋与湖沼*, 2004, 35(4): 342-350.
- Jiang G J, Yu R C, Wang Y F, *et al.* Identification of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in haemocytes of shrimp *Fenneropenaeus Chinensis* and enzyme activity during its infected by white spot syndrome virus[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2004, 35(4): 342-350(in Chinese).
- [21] Holmblad T, Söderhäll K. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity[J]. *Aquaculture*, 1999, 172(1-2): 111-123.
- [22] 王芸, 李健, 李吉涛, 等. pH胁迫对中国明对虾抗氧化系统酶活力及基因表达的影响[J]. *中国水产科学*, 2011, 18(3): 556-564.
- Wang Y, Li J, Li J T, *et al.* Effects of pH stress on antioxidant system enzyme activities and gene expression of *Fenneropenaeus chinensis*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(3): 556-564(in Chinese).
- [23] 王芸, 胡义波, 姜乃澄. 氨态氮、亚硝态氮对罗氏沼虾免疫相关酶类的影响[J]. *浙江大学学报(理学版)*, 2005, 32(6): 698-705.
- Wang Y, Hu Y B, Jiang N C. Effects of ammonia-N and nitrite-N on immune enzymes of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Journal of Zhejiang University (Science Edition)*, 2005, 32(6): 698-705(in Chinese).
- [24] Kohn K W, Ewig R A. Effect of pH on the bleomycin-induced DNA single-strand scission in L1210 cells and the relation to cell survival[J]. *Cancer Research*, 1976, 36(10): 3839-3841.
- [25] Lee R, Kim G B. Comet assays to assess DNA damage and repair in grass shrimp embryos exposed to phototoxicants[J]. *Marine Environmental Research*, 2002, 54(3-4): 465-469.
- [26] Truchot J P. Respiratory function of Arthropod hemocyanins[M]//Mangum C P. Blood and tissue oxygen carriers. Berlin, Heidelberg: Springer, 1992: 377-410.
- [27] Bridges C R. Modulation of haemocyanin oxygen affinity: properties and physiological implications in a changing world[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2001, 204(5): 1021-1032.
- [28] Sohel M S I, Ullah M H. Ecohydrology: a framework for overcoming the environmental impacts of shrimp aquaculture on the coastal zone of Bangladesh[J]. *Ocean & Coastal Management*, 2012, 63: 67-78.
- [29] Lemonnier H, Bernard E, Boglio E, *et al.* Influence of sediment characteristics on shrimp physiology: pH as principal effect[J]. *Aquaculture*, 2004, 240(1-4): 297-312.
- [30] Ford D L, Churchwell R L, Kachtick J W. Comprehensive analysis of nitrification of chemical processing wastewaters[J]. *Water Pollution Control Federation*, 1980, 52(11): 2726-2746.
- [31] Ebeling J M, Timmons M B, Bisogni J J. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia – nitrogen in aquaculture systems[J]. *Aquaculture*, 2006, 257(1-4): 346-358.
- [32] Chen S L, Ling J, Blancheton J P. Nitrification kinetics of biofilm as affected by water quality factors[J]. *Aquacultural Engineering*, 2006, 34(3): 179-197.
- [33] Ebeling J M, Timmons M B. Recirculating aquaculture systems[M]//Tidwell J H. Aquaculture production systems. Ames, Iowa: John Wiley & Sons, Inc., 2012.
- [34] Xian J A, Wang A L, Hao X M, *et al.* *In vitro* toxicity of nitrite on haemocytes of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*, using flow cytometric analysis[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2012, 156(2): 75-79.
- [35] Lin Y C, Chen J C. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels[J]. *Aquaculture*, 2003, 224(1-4): 193-201.
- [36] 张瑜斌, 章洁香, 詹晓燕, 等. 高位虾池养殖过程主要理化因子的变化及水质评价[J]. *水产科学*, 2009, 28(11): 628-634.
- Zhang Y B, Zhang J X, Zhan X Y, *et al.* Changes in main physicochemical factors in water and assessment of water quality during culture in higher-level shrimp ponds[J]. *Fisheries Science*, 2009, 28(11): 628-634(in Chinese).

## Effect of pH variation on survival of *Litopenaeus vannamei* reared in ponds and its physiological mechanisms

LU Lingzi, WANG Yan\*, HASAN Md Mehadi

(Ocean College, Zhejiang University, Zhoushan 316200, China)

**Abstract:** Generally, pH in the ponds of *Litopenaeus vannamei* farming exhibits long term trend as well as diel variation. Understanding the effect of pH variation on survival of *L. vannamei* is critical for improving water quality management in commercial white shrimp farming. In the present study, two independent experiments each with single factor design were conducted to evaluate the effects of pH level and amplitude of pH diel variation on survival of *L. vannamei*. Meanwhile, the physiological mechanisms were analyzed. In experimental I, four pH levels (6.6, 7.6, 8.6 and 9.6) were evaluated, and the average pH level (8.2) observed in commercial ponds was used as control. In experimental II, three amplitude of pH diel variation (7.5–8.2, 7.5–9.5, 7.5–10.0) were evaluated, and the average amplitude of pH diel variation (7.5–8.7) observed in commercial ponds was used as control. The results showed that pH level can significantly affect survival of *L. vannamei*, hemolymph cell count, and activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathionereductase (GR), catalase (CAT), phenoloxidase (PO) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) *in vivo*. Mortality of *L. vannamei* significantly increased, while activities of SOD, GSH-Px, GR, CAT, PO and iNOS declined, when environmental pH climbed from 7.6 to 9.6. On the other hand, amplitude of diel pH variation can significantly affect survival of *L. vannamei* and activities of antioxidant enzymes (SOD, GSH-Px, GR and CAT), but did not result in significant change in glutathione content. Mortality of *L. vannamei* significantly increased, while activities of SOD, GSH-Px, GR and CAT decreased, when amplitude of diel pH variation was extended from 7.5–8.2 to 7.5–10.0. This study reveals that pH level and amplitude of diel pH variation are important environmental factors responsible for survival of *L. vannamei*, and stress induced by unsuitable pH should be the physiology mechanism since high mortality of *L. vannamei* was accompanied by the change in activities of SOD, GSH-Px, CAT and PO. According to the present study, it is recommended that proper pH control should be listed as an important content for environmental management in *L. vannamei* pond farming.

**Key words:** *Litopenaeus vannamei*; pH; survival rate; antioxidant enzyme; hemolymph cell; glutathione

**Corresponding author:** WANG Yan. E-mail: ywang@zju.edu.cn

**Funding projects:** National Key Technology Research and Development Program of the Ministry of Science and Technology of China (2015BAD13B04)