

DOI: 10.12264/JFSC2024-0214

## 盐碱胁迫对黄河口野生中华绒螯蟹的组织结构和抗氧化能力的影响

王小凡, 刘国涛, 王忠凯, 郝朋元, 张龙, 陈允兴, 李玉全

青岛农业大学海洋科学与工程学院, 山东 青岛 266109

**摘要:** 为探究黄河口野生中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)对盐碱水环境的生理适应能力, 分别设置不同盐度(14, 35)、碱度(26, 55 mmol/L)单因子胁迫和盐碱交互胁迫(盐度 6, 14; 碱度 10, 26 mmol/L)环境, 对黄河口中华绒螯蟹实施持续 96 h 盐碱胁迫处理, 研究盐碱胁迫下中华绒螯蟹的存活率以及前鳃、后鳃和肝胰腺的组织结构变化, 并检测了组织中超氧化物歧化酶(SOD)的酶活性和谷胱甘肽(GSH)的浓度。结果显示, 黄河口中华绒螯蟹在 24、48、72 和 96 h 时的半致死盐度(LC<sub>50</sub>)分别为 65.90、55.39、53.29 和 50.14, 安全盐度为 13.97; 半致死碱度(LC<sub>50</sub>)分别为 119.4、86.48、64.49 和 58.98 mmol/L, 安全碱度为 25.96 mmol/L。组织切片观察确认, 在盐碱胁迫下, 前鳃的损伤程度高于后鳃, 碱度胁迫相较于盐度胁迫造成了更严重的组织损伤, 而盐碱交互胁迫的损伤效应则超过了单一胁迫因子的影响。在持续 96 h 的盐碱胁迫下, 中华绒螯蟹的前鳃和后鳃中与抗氧化相关的 SOD 酶活性和 GSH 浓度经历了先升高后降低的变化趋势, 特别是在胁迫 72 h 后, SOD 酶活性和 GSH 浓度显著下降至低于初始水平, 而肝胰腺中 SOD 酶活性从胁迫 24 h 后显著降低。以上结果表明, 中华绒螯蟹能够激活其抗氧化系统以适应盐碱胁迫, 但当环境胁迫的强度超出其抗氧化系统的应对能力时, 抗氧化酶的活性会受到抑制。

**关键词:** 中华绒螯蟹; 黄河口; 盐度; 碱度; 胁迫; 耐受; 抗氧化酶; 盐碱水

中图分类号: S931

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)08-0988-13

中国约有 0.46 亿  $\text{hm}^2$  的盐碱水域面积, 大多为非海洋性咸水, 其具有显著的高盐碱度、高离子系数和离子比例失衡等特点<sup>[1-2]</sup>。盐碱水环境的盐度和碱度显著影响水生动物的生长、发育、生理代谢和组织功能, 多数水生动物无法在其中长时间生存, 导致大量盐碱水资源长期处于未被利用的状态<sup>[3-5]</sup>。在碳酸盐盐碱水环境中, 碳酸盐碱度的升高引起水体 pH 和  $\text{HCO}_3^-$  浓度的同步上升, 导致水生动物鳃上皮细胞受损, 进而干扰鳃组织的离子交换功能<sup>[6-8]</sup>。此外, 高盐度胁迫对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的肝胰腺管壁构成损害, 严重时甚至可引发肝小管的坏死<sup>[9]</sup>; 高碱

度胁迫也会导致大鳞鲃(*Luciobarbus capito*)肝细胞结构的萎缩和细胞核的移位<sup>[10]</sup>。更为严重的是, 盐碱胁迫引发水生动物体内大量活性自由基的生成, 不仅削弱了它们的免疫能力, 还对生理功能造成了损害<sup>[11-12]</sup>。在抗氧化防御方面, 盐度胁迫下的凡纳滨对虾和斑节对虾(*Penaeus monodon*)体内的超氧化物歧化酶(SOD)活性显著升高, 以维持自由基含量的动态平衡<sup>[13-14]</sup>; 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)在碳酸盐碱度胁迫后, 其 SOD 活性则呈现先增加后下降的变化趋势<sup>[15]</sup>。

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)作为中国重要的经济养殖蟹类, 具有较强的抗逆性, 是黄河流

收稿日期: 2024-06-25; 修订日期: 2024-08-10.

基金项目: 山东省重点研发计划项目(2021LZGC207); 山东省现代农业产业技术体系虾蟹类创新团队项目(SDAIT-15-011); 东营市科技创新重大专项(2023ZDJH30).

作者简介: 王小凡(1998-), 男, 硕士研究生, 研究方向为虾蟹遗传育种, E-mail: 15650196869@163.com.

通信作者: 李玉全, 教授, 研究方向为虾蟹遗传育种与增养殖. E-mail: jiangfangqian@163.com

域盐碱水养殖的目标蟹类, 但与其庞大的产业规模与巨大的苗种需求相比, 中华绒螯蟹的良种数量仍然匮乏, 也尚未有针对耐盐碱性状进行选育的中华绒螯蟹新品种。尽管我国已经选育出, 并经全国水产原种和良种审定委员会审定通过了 6 个中华绒螯蟹良种, 但选育的良种源自长江水系或辽河水系, 尚无源自黄河水系的新品种。这些选育的中华绒螯蟹良种引入黄河流域盐碱水域养殖后, 造成了黄河水系中华绒螯蟹种质混杂。因此, 开展黄河水系中华绒螯蟹耐盐碱种质创制的工作十分必要而迫切。本研究以黄河水系中华绒螯蟹的典型代表——黄河口野生中华绒螯蟹为研究对象, 测定了其耐盐度(NaCl)、耐碱度(NaHCO<sub>3</sub>)以及盐碱交互作用的耐受能力, 并研究了不同盐碱胁迫对其抗氧化能力以及肝胰腺和鳃组织结构的影响, 以期为黄河水系中华绒螯蟹的盐碱水养殖和育种实践提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

黄河口野生中华绒螯蟹采集自山东省东营市黄河三角洲的自然水域。实验所用中华绒螯蟹的体重范围为 32.5~42.5 g。实验开始前, 在青岛农业大学综合养殖中心的玻璃缸中进行了为期 15 d 的暂养, 以适应实验环境。暂养所用的玻璃缸尺寸为 60 cm×50 cm×40 cm, 每个缸中均放置了遮蔽物, 用以防止蟹类之间的相互打斗。每个缸中加入 30 L 的淡水, 并放置 10 只中华绒螯蟹, 水温维持在(20±1) °C。暂养期间, 每天更换 1/3 的水量, 同时清理排泄物和残饵。投喂工作则采用每日 9:00、14:00、20:00 定时投喂的方式, 提供饲料、杂鱼等食物。正式实验前停料 24 h。

### 1.2 盐碱胁迫半致死实验

实验所用水源为经过充分曝气的自来水, 通过添加海水素或 NaHCO<sub>3</sub> 调节至所需的盐度或碱度, 随后静置 24 h 以确保溶质完全溶解。实验期间, 每天使用盐度计测量水体的盐度, 并通过甲基橙标定法测试碱度, 确保水体盐度和碱度稳定在预设的目标值。

在正式实验开始前, 通过预实验确定了中华

绒螯蟹在 24 h 内全部死亡的最低盐碱浓度, 以及在 96 h 内全部存活最高盐碱浓度。单因子胁迫实验中, 盐度和碱度各设立了 1 个对照组以及 6 个不同浓度梯度的实验组, 其中盐度梯度分别为 25、35、45、55、65、75, 碱度梯度分别为 50、66.7、83.3、100、116.7、133.3 mmol/L。每个实验组均设有 3 组平行, 每个缸中放入 10 只体质健壮、规格一致、附肢完整的中华绒螯蟹。实验过程中, 观察并记录了不同浓度梯度下蟹类的行为变化, 以及在 24、48、72、96 h 的死亡和存活数量。实验期间, 及时移除死亡蟹。实验数据通过 Graphpad prism 9 进行分析, 盐度、碱度单独胁迫的半致死浓度(LC<sub>50</sub>)及其 95%置信区间采用寇氏法计算。安全浓度 SC 参照雷衍之等<sup>[16]</sup>方法计算。

### 1.3 盐碱胁迫实验

基于半致死实验确定的安全浓度和半致死浓度, 本研究设计了盐、碱及盐碱交互胁迫的实验浓度。在盐度或碱度胁迫实验中, 高盐度胁迫组盐度设置为 35, 低盐度胁迫组盐度为 14; 高碱度胁迫组为 55 mmol/L, 低碱度胁迫组为 26 mmol/L, 用以执行单因素胁迫实验。此外, 参照《山东省盐碱地生态渔业发展规划(2022-2030 年)》中关于山东省重度盐碱地的标准——盐度 ≥ 6、碱度 ≥ 10 mmol/L, 以盐度 6、碱度 10 mmol/L 设置盐碱交互胁迫实验中的低盐低碱处理组。根据单因素胁迫实验中的低盐、低碱处理组浓度, 设置盐碱交互胁迫中的高盐高碱(14、26 mmol/L)处理组, 旨在探究在盐度和碱度的共同作用下, 中华绒螯蟹展现出的与单一胁迫不同的生理和分子响应机制。此外, 盐碱交互胁迫还设置了高盐低碱(盐度 14、碱度 10 mmol/L)和低盐低碱(盐度 6、碱度 10 mmol/L)处理组。每个实验组均设有 3 组平行, 每个缸中放入 10 只中华绒螯蟹。实验期间, 每日观察并记录蟹的行为状态, 及时移除死亡个体, 并停止投喂。为维持水体盐碱度的稳定性, 每日对水的盐碱度进行微调。实验持续 96h 后, 每组选取 3 只个体, 取出中华绒螯蟹的肝胰腺、前鳃和后鳃组织, 分别采用 4%组织细胞固定液(索莱宝, 北京)进行固定保存, 以及液氮固定后存放于 -80 °C 的冰箱中。

### 1.4 组织学观察

在 4%组织细胞固定液(索莱宝, 北京)中将胁迫后中华绒螯蟹的前鳃、后鳃、肝胰腺固定满 24 h 后, 转移至 70%乙醇中, 并进行酒精梯度脱水。纯酒精与二甲苯配合进行组织透明后进行石蜡包埋。用切片机(徕卡, 德国)切出 5~7  $\mu\text{m}$  薄片, 用苏木精-伊红染色, 中性树胶封片后将切片置于正置荧光显微镜 Axio Scope A1 (蔡司, 德国)下观察和拍照。

### 1.5 酶活性分析

在进行酶活性测定之前, 首先准确称量肝胰腺、前鳃、后鳃组织, 按照组织重量(g): 体积(mL)=1:9 的比例, 向组织中加入 9 倍体积的 PBS, 在冰水浴条件下进行匀浆处理, 制备成 10%的组织匀浆液。随后, 以 2500~3000 r/min 的速度离心 10 min。对于肝胰腺组织, 在离心后需去除上层的脂质层, 仅取上清液用于相关酶活性的测定。采用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒, 对前鳃、后鳃、肝胰腺中的谷胱甘肽(GSH)浓度和 SOD 酶活性进行测定, 操作步骤严格遵循试剂盒说明书。

## 2 结果与分析

### 2.1 盐度胁迫和碱度胁迫对中华绒螯蟹的毒性效应

对照组中华绒螯蟹表现出正常的行为模式, 它们游动自如, 而水质保持清澈。相比之下, 在盐度胁迫实验组中, 随着盐度的逐步增加, 中华绒螯蟹的应激反应也愈发显著。在 25 盐度组, 中华绒螯蟹 1 h 后即表现出明显的不安和游动加速。随着盐度的上升, 这种行为呈加剧趋势。当实验

进行至 6 h 后, 可以观察到所有实验组的中华绒螯蟹游动速度减缓, 部分个体匍匐于水底, 活力明显低于对照组。胁迫 12 h 后, 65 和 75 盐度实验组中的中华绒螯蟹出现了行动迟缓、附肢脱落、部分个体肚皮上翻、呼吸功能减弱等中毒症状。至 24 h 时, 75 盐度实验组中的 30 只个体已全部死亡, 表现为肚皮上翻、附肢僵直或脱落。在 25、35 和 45 盐度的实验组中, 虽然未观察到死亡现象, 但个体的行为受到了明显的抑制, 表现为反应迟钝和四肢扭曲。随着盐度的升高和胁迫时间的延长, 中华绒螯蟹的死亡率逐渐增加。至 72 h 后, 65 盐度实验组的中华绒螯蟹也已全部死亡。通过计算, 盐度对中华绒螯蟹在 24、48、72 和 96 h 时  $\text{LC}_{50}$  分别为 65.90、55.39、53.29 和 50.14。根据安全浓度计算公式, 得出的安全浓度为 13.97 (表 1)。

碱度胁迫下, 中华绒螯蟹的应急反应与盐度胁迫相似。实验初期, 50 mmol/L 和 66.7 mmol/L 碱度处理组中的个体未表现出异常行为, 而更高碱度处理组的个体则出现了明显的不安和挣扎, 试图浮到水面。24 h 后, 133.3 mmol/L 实验组的中华绒螯蟹全部死亡, 死亡的蟹类通常表现为腹部向上和附肢脱落。其他碱度处理组也出现死亡个体, 而存活的个体则显示出活动受限、反应迟钝、对外界刺激缺乏反应、附肢脱落, 并且体表覆盖有一层白色黏液。72 h 后, 116.7 mmol/L 碱度处理组的中华绒螯蟹也全部死亡。通过计算得出 24 h、48 h、72 h 和 96 h 的半致死碱度分别为 119.4 mmol/L、86.48 mmol/L、64.49 mmol/L 和 58.98 mmol/L。依据安全浓度的计算公式, 中华绒螯蟹的安全碱度为 25.96 mmol/L (表 2)。

表 1 盐度对中华绒螯蟹的毒性实验结果  
Tab. 1 Toxicity test results of salinity to *Eriocheir sinensis*

胁迫时间/h stress time	死亡率/% mortality rate							半致死浓度 $\text{LC}_{50}$	安全浓度 safe concentration
	对照组 control	盐度胁迫组 salinity stress group							
		25	35	45	55	65	75		
24	0	0	0	0	10.00	40.00	100.00	65.90 (65.90-68.28)	13.97
48	0	0	0	0	50.00	86.70	100.00	55.39 (53.38-57.54)	
72	0	0	0	3.33	60.00	100.00	100.00	53.29 (51.51-54.83)	
96	0	0	0	3.33	86.70	100.00	100.00	50.14 (49.98-50.31)	

注: 半致死浓度括号内为 95%置信区间。

Note: The value in parentheses is the 95% confidence interval.

表 2 碱度对中华绒螯蟹毒性实验结果  
Tab. 2 Toxicity test results of alkalinity to *Eriocheir sinensis*

胁迫时间/h stress time	死亡率/% mortality rate							半致死浓度/(mmol/L) LC <sub>50</sub>	安全浓度/(mmol/L) safe concentration
	对照 control	碱度/(mmol/L) alkalinity							
		50	66.7	83.3	100	116.7	133.3		
24	0	3.33	20.00	23.33	23.33	33.33	100.00	119.40(87.35–131.90)	
48	0	6.67	36.67	36.67	56.67	83.33	100.00	86.48(71.06–101.4)	25.96
72	0	10.00	76.67	93.33	96.67	100.00	100.00	64.49(58.57–62.29)	
96	0	13.33	80.00	100.00	100.00	100.00	100.00	58.98(58.26–59.71)	

注: 半致死浓度括号内为 95%置信区间.

Note: aThe value in parentheses is the 95% confidence interval.

2.2 盐度、碱度以及盐碱交互胁迫对组织的损伤作用

对照组中华绒螯蟹的肝胰腺呈现出规律的肝小管排列, 其结构完整, 上皮细胞有序排列, 管

腔形态正常(图 1a)。14 盐度胁迫下, 肝小管结构未发生显著变化或损伤, 尽管观察到部分肝小管管腔扩张, 细胞核排列较为密集, 但细胞质中出现了少量空泡(图 1b)。相对地, 35 盐度胁迫下, 肝

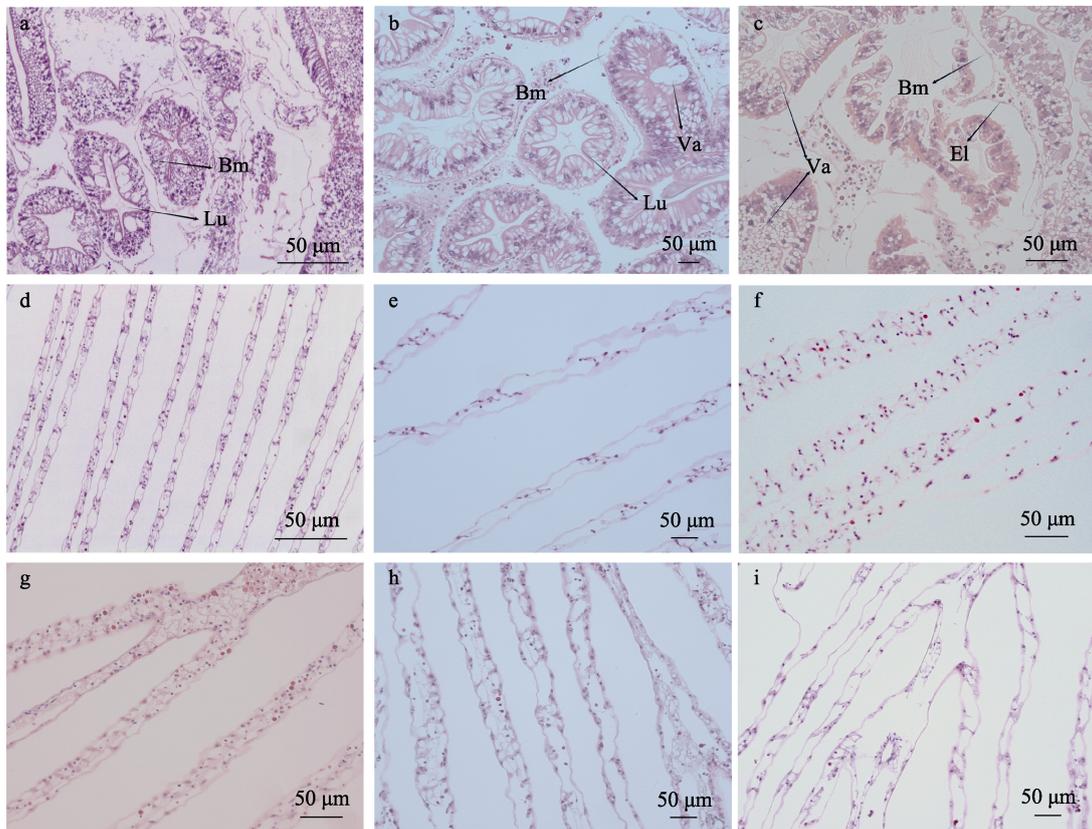


图 1 中华绒螯蟹在盐度胁迫下的肝胰腺、前鳃和后鳃的组织切片

a. 对照组肝胰腺; b. 14 盐度胁迫组的肝胰腺; c. 35 盐度胁迫组的肝胰腺; d. 对照组前鳃; e. 14 盐度胁迫组的前鳃; f. 35 盐度胁迫组的前鳃; g. 对照组后鳃; h. 14 盐度胁迫组的后鳃; i. 35 盐度胁迫组的后鳃.

Bm: 基膜; Lu: 管腔; Va: 空泡; EI: 上皮细胞.

Fig. 1 Histological section of the hepatopancreas, anterior gills, and posterior gills of *Eriocheir sinensis* under salinity stress a. Hepatopancreas of control; b. Hepatopancreas under 14 salinity stress; c. Hepatopancreas under 35 salinity stress; d. Anterior gills of control; e. Anterior gills under 14 salinity stress; f. Anterior gills under 35 salinity stress; g. Posterior gills of control; h. Posterior gills under 14 salinity stress; i. Posterior gills under 35 salinity stress. Bm: basal membrane; Lu: lumen; Va: vacuole; EI: epithelial cell.

小管的上皮细胞与基底膜之间出现了分离,部分基底膜脱落,细胞质间的空泡数量增多,管腔受压缩而缩小,上皮细胞出现部分裂解,细胞质连接也变得较为松散(图 1c)。

对于前鳃组织,14 盐度胁迫下,与对照组相比,中华绒螯蟹的鳃叶出现了轻微的不规则增厚,鳃丝血管扩张(图 1e)。而 35 盐度胁迫下,前鳃的损伤更为严重,表现为鳃叶的不规则增厚,部分上皮层受损,细胞核呈现聚集现象(图 1f)。相似地,14 盐度胁迫下,后鳃的变化并不明显,仅观察到鳃叶轻微增厚和血管略微扩张(图 1h)。当胁迫盐度提升至 35 时,后鳃的血管显著增大,且角质膜

出现了隆起(图 1i)。

与对照组相比,26 mmol/L 碱度胁迫下,肝胰腺的上皮细胞核排列相对有序,但在上皮细胞质中观察到大量且排列紧密的空泡。此外,部分肝小管的上皮细胞核出现了肿大现象(图 2b)。当碱度增至 55 mmol/L 时,肝胰腺的上皮细胞与基底膜之间发生分离,细胞破裂现象明显,细胞核呈现流出和溶解迹象,导致肝小管组织结构严重紊乱(图 2c)。

在低碱胁迫下,前鳃的血管扩张,部分细胞核呈现聚集趋势,鳃叶出现不规则增厚,同时角质层的厚度也有所增加(图 2e)。随着碱度提升至

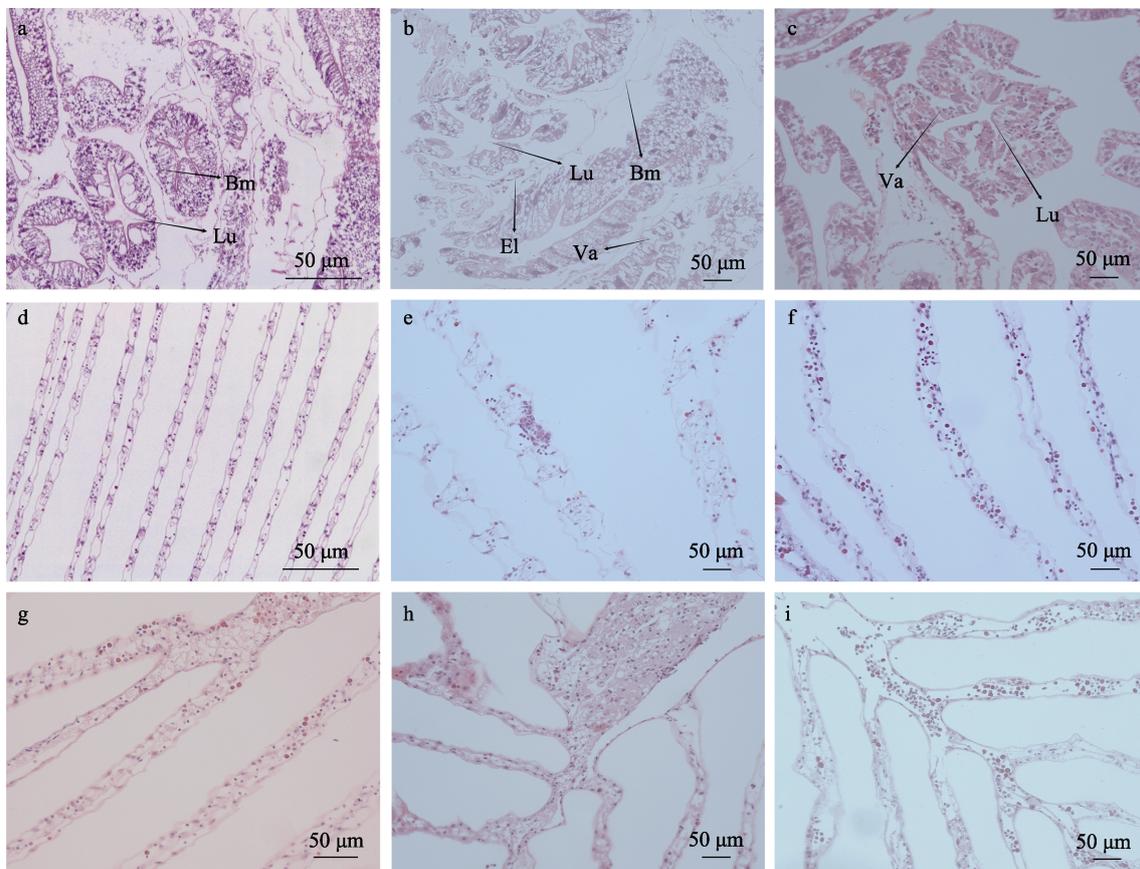


图 2 中华绒螯蟹在碱度胁迫下的肝胰腺、前鳃和后鳃的组织切片

a. 对照组肝胰腺; b. 26 mmol/L 碱度胁迫下的肝胰腺; c. 55 mmol/L 碱度胁迫下的肝胰腺; d. 对照组前鳃; e. 26 mmol/L 碱度胁迫下的前鳃; f. 55 mmol/L 碱度胁迫下的前鳃; g. 对照组后鳃; h. 26 mmol/L 碱度胁迫下的后鳃; i. 55 mmol/L 碱度胁迫下的后鳃。

Bm: 基膜; Lu: 管腔; Va: 空泡; EI: 上皮细胞。

Fig. 2 Histological section of the hepatopancreas, anterior gills, and posterior gills of *Eriocheir sinensis* under alkalinity stress a. Hepatopancreas in control group; b. Hepatopancreas under 26 mmol/L alkalinity stress; c. Hepatopancreas under 55 mmol/L alkalinity stress; d. Anterior gills in control group; e. Anterior gills under 26 mmol/L alkalinity stress; f. anterior gills under 55 mmol/L alkalinity stress; g. Posterior gills in control group; h. Posterior gills under 26 mmol/L alkalinity stress; i. Posterior gills under 55 mmol/L alkalinity stress. Bm: basal membrane; Lu: lumen; Va: vacuole; EI: epithelial cell.

55 mmol/L, 前鳃的上皮层损伤加剧, 细胞核聚集更为显著, 角质层进一步增厚, 血腔扩张更加明显(图 2f)。在碱胁迫条件下, 中华绒螯蟹的后鳃损伤情况也与前鳃相似。在低碱胁迫下, 后鳃鳃叶呈现不规则增厚, 角质层轻微增厚(图 2h)。而在高碱胁迫下, 鳃丝中的细胞核聚集现象更为严重, 血腔进一步扩张, 上皮层损伤也更为明显(图 2i)。

盐碱交互胁迫下, 随着盐碱浓度的逐步增加, 中华绒螯蟹的肝胰腺组织损伤呈现出加剧的趋势。在低盐低碱胁迫下, 观察到肝小管的基底膜与上皮细胞发生分离, 空泡数量显著增多, 导致肝小管管腔受压缩(图 3b)。进一步的, 低盐高碱(图 3c)和高盐低碱(图 3e)胁迫对肝胰腺造成的损伤具有相似性, 表现为基底膜与上皮细胞之间的明显分离, 空泡数量进一步增多。在高盐高碱胁迫环境下, 损伤更为严重, 肝小管细胞质中观察到大量空泡的出现, 肝小管组织结构遭受破坏, 肝小管间的基底膜出现了破裂和脱落现象, 部分上皮细胞出现裂解, 甚至有细胞核游离于细胞外的情况发生(图 3d)。

低盐低碱胁迫下, 中华绒螯蟹的前鳃鳃叶出现了不规则增厚, 同时血腔体积增大(图 3g)。在高盐低碱胁迫条件下, 前鳃组织的损伤相对较轻, 主要表现为鳃丝血腔的扩张和细胞的聚集(图 3j)。然而, 低盐高碱胁迫下, 除了观察到与高盐低碱胁迫相似的血腔增大和细胞聚集外, 还伴随有上皮层损伤、细胞溶解以及角质膜隆起的现象(图 3h)。高盐高碱胁迫下, 前鳃组织遭受的损伤最为严重, 鳃丝中的血腔极度扩张, 内部柱状细胞出现了溶解和粘连, 细胞核也有从细胞中溶出的现象(图 3i)。对于后鳃组织, 低盐低碱胁迫下, 其损伤并不如前鳃显著(图 3l)。低盐高碱和高碱低盐胁迫下, 后鳃的损伤也普遍低于前鳃(图 3m, 3o)。只有在高盐高碱的环境中, 后鳃的受损情况才与前鳃相似(图 3n)。

### 2.3 盐度、碱度以及盐碱交互胁迫对 GSH 浓度和 SOD 酶活性的影响

在前鳃组织中, 经过低盐胁迫 24 h 处理后, GSH 浓度显著上升并达到峰值。然而, 在随后的

24~72 h 内, GSH 浓度呈现下降趋势, 直至 96 h 后再次上升至峰值。在高盐胁迫下, GSH 浓度在 72 h 显著升高, 但在 96 h 回落至初始水平(图 4a)。低盐胁迫下, SOD 活性呈现波动状态, 并在 96 h 时恢复至初始水平; 在高盐胁迫下, SOD 活性呈现上升趋势, 并在 96 h 达到峰值(图 4b)。

在后鳃组织中, 低盐胁迫下 GSH 浓度初始上升, 尽管有所下降, 但在 96 h 后显著升高并达到峰值; 而在高盐胁迫下, GSH 浓度在 48 h 时显著上升, 随后下降(图 4c)。无论是高盐还是低盐胁迫, SOD 活性在 48 h 和 72 h 时均显著升高, 但在高盐胁迫下, 96 h 时 SOD 活性又显著下降(图 4d)。

对于肝胰腺组织, 在低盐胁迫下, GSH 浓度在 48 h 时显著升高, 并维持至 72 h, 但在 96 h 时下降至初始水平; 在高盐胁迫条件下, GSH 浓度在 24~72 h 内下降, 但在 96 h 时显著上升, 达到峰值(图 4e)。在低盐和高盐胁迫下, SOD 活性均呈现显著下降趋势, 并持续维持在较低水平(图 4f)。

低碱胁迫下, 前鳃 GSH 浓度在 48 h 时显著升高, 随后在 72 h 时显著下降, 并在 96 h 时恢复至初始水平; 高碱胁迫下, GSH 浓度在 0 至 72 h 内无显著变化, 但在 96 h 时显著降低(图 5a)。低碱胁迫下 SOD 活性变化不显著, 但在高碱胁迫后, SOD 活性表现出先升高后降低的趋势, 在 96 h 时活性显著低于初始水平(图 5b)。

后鳃 GSH 浓度在低碱和高碱胁迫下的变化趋势相似, 在 0 至 48 h 内都呈现显著上升趋势, 而在 72 h 时显著下降至初始水平, 但 96 h 时又显著升高(图 5c)。低碱胁迫下 SOD 活性在 72 h 内变化不显著, 但在 96 h 时活性显著升高; 高碱胁迫后, SOD 活性表现出先升高后降低的趋势, 96 h 时活性显著低于初始水平(图 5d)。

肝胰腺中, 低碱胁迫下 GSH 浓度在 24 h 时显著升高, 并持续保持较高水平; 而高碱胁迫下, GSH 浓度在 48 h 时显著升高, 72 h 时又显著下降至初始水平, 但在 96 h 时再次显著升高(图 5e)。无论是低碱还是高碱胁迫, SOD 活性都显著降低(图 5f)。

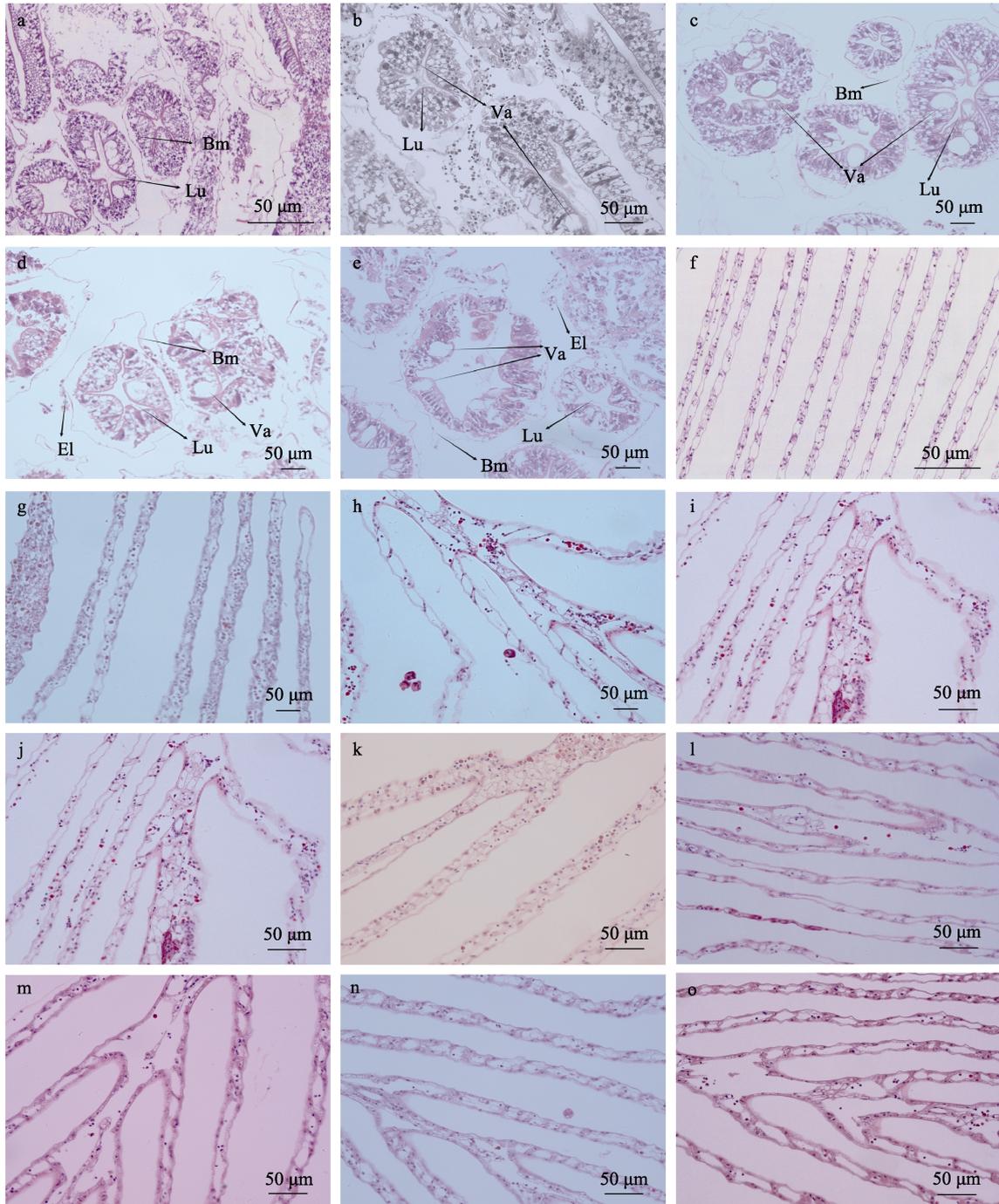


图 3 中华绒螯蟹在盐碱交互胁迫下的肝胰腺、前鳃和后鳃的组织切片

a. 未受胁迫的肝胰腺; b. 低盐低碱胁迫下的肝胰腺; c. 低盐高碱胁迫下的肝胰腺; d. 高盐高碱胁迫下的肝胰腺; e. 高盐低碱胁迫下的肝胰腺; f. 未受胁迫的前鳃; g. 低盐低碱胁迫下的前鳃; h. 低盐高碱胁迫下的前鳃; i. 高盐高碱胁迫下的前鳃; j. 高盐低碱胁迫下的前鳃; k. 未受胁迫的后鳃; l. 低盐低碱胁迫下的后鳃; m. 低盐高碱胁迫下的后鳃; n. 高盐高碱胁迫下的后鳃; o. 高盐低碱胁迫下的后鳃。Bm: 基膜; Lu: 管腔; Va: 空泡; EI: 上皮细胞。

Fig. 3 Histological section of the hepatopancreas, anterior gills, and posterior gills of *Eriocheir sinensis* under saline-alkali stress a. Hepatopancreas; b. Hepatopancreas; c. Hepatopancreas; d. Hepatopancreas; e. Hepatopancreas; f. anterior gills; g. anterior gills; h. anterior gills; i. anterior gills; j. anterior gills; and k. posterior gills not subjected to stress; and l. posterior gills under low-salinity and low-alkalinity stress; and m. posterior gills under low-salinity and high-alkalinity stress; and n. posterior gills under high-salinity and high-alkalinity stress; and o. posterior gills under low-salinity and low-alkalinity stress. Bm: Basal membrane; Lu: Lumen; Va: Vacuole; EI: Epithelial cell.

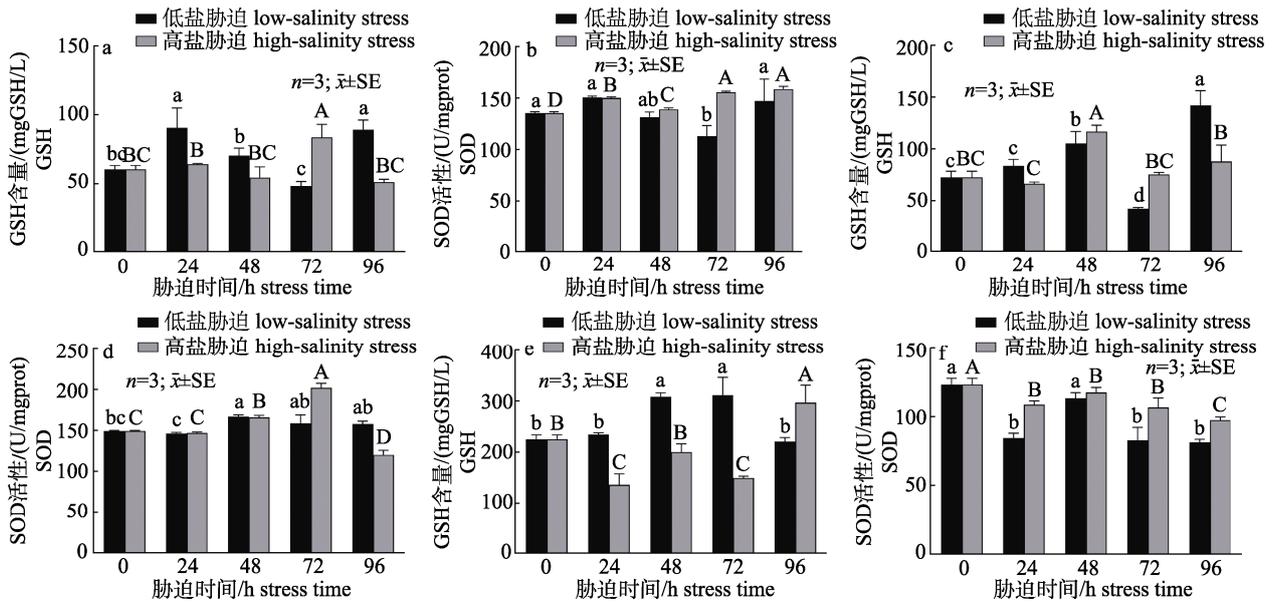


图 4 盐胁迫对中华绒螯蟹 GSH 浓度、SOD 酶活性的影响

a. 前鳃 GSH 含量; b. 前鳃 SOD 酶活性; c. 后鳃 GSH 含量; d. 后鳃 SOD 酶活性; e. 肝胰腺 GSH 含量; f. 肝胰腺 SOD 酶活性。  
上标不同小写字母表示低盐胁迫组之间差异显著( $P<0.05$ ), 上标不同大写字母表示高盐胁迫组之间差异显著( $P<0.05$ )。

Fig. 4 The GSH concentration and SOD enzyme activities of *Eriocheir sinensis* under salinity stress

The GSH concentration in a. anterior gills, The SOD enzyme activities in b. anterior gills, c. posterior gills, d. posterior gills, and e. hepatopancreas; and f. hepatopancreas. Data were shown as mean+SEM ( $n=3$ ). Different small letters represent significant differences between different time points in the low-salinity group ( $P<0.05$ ), and different capital letters represent significant differences between different time points in the high-salinity group ( $P<0.05$ ).

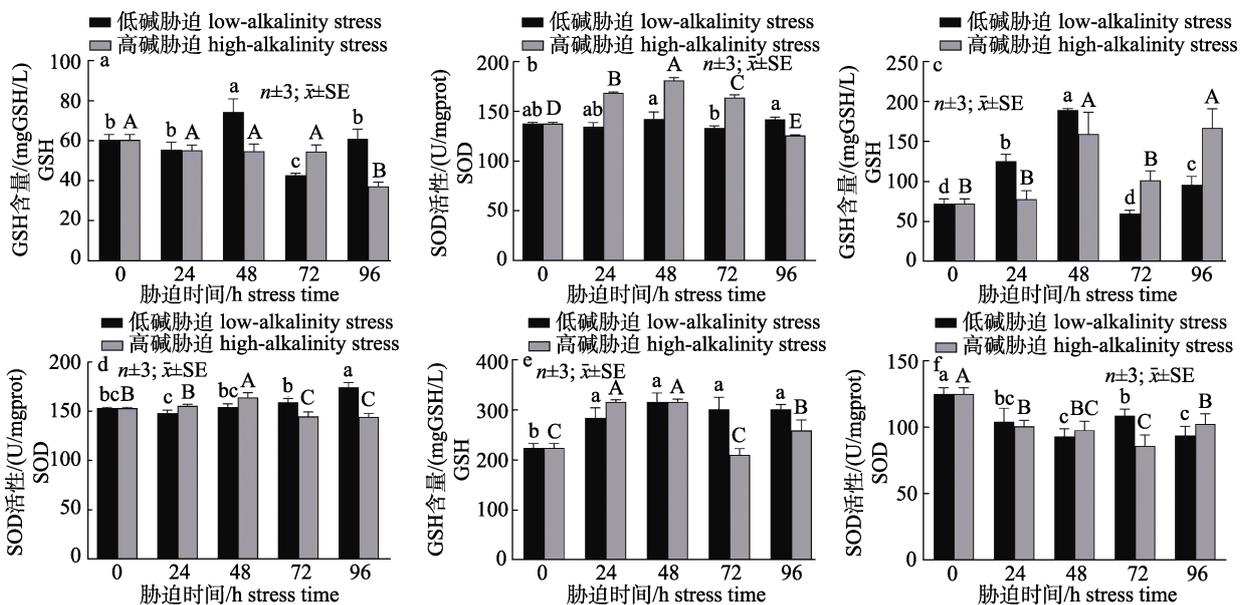


图 5 碱胁迫对中华绒螯蟹 GSH 浓度、SOD 酶活性的影响

a. 前鳃 GSH 含量, b. 前鳃 SOD 酶活; c. 后鳃 GSH 含量; d. 后鳃 SOD 酶活; e. 肝胰腺 GSH 含量; f. 肝胰腺中 SOD 酶活。  
上标不同小写字母表示低碱胁迫组之间差异显著( $P<0.05$ ), 上标不同大写字母表示高碱胁迫组之间差异显著( $P<0.05$ )。

Fig. 5 The GSH concentration and SOD enzyme activities of *Eriocheir sinensis* under alkalinity stress

The GSH concentration in a. GSH concentration in anterior gill, b. SOD enzyme activity anterior gills, c. GSH concentration in posterior gills, d. SOD enzyme activity posterior gills, and e. GSH concentration in hepatopancreas; and f. SOD enzyme activity hepatopancreas. Different small letters represent significant differences between different time points in the low-alkalinity group ( $P<0.05$ ), and different capital letters represent significant differences between different time points in the high-alkalinity group ( $P<0.05$ ).

高盐高碱胁迫下(图 6a~f), 前鳃组织的 GSH 浓度在 24 h 时显著上升, 随后在 96 h 时回落至正常水平。后鳃组织的 GSH 浓度则从 24 h 开始上升, 并持续至 96 h。与此同时, 肝胰腺的 GSH 浓度在 24 h 时下降, 但在 96 h 时显著升高, 达到峰值。前鳃组织的 SOD 活性随时间逐步增加, 而后鳃组织的 SOD 活性在 24 h 后降低, 并维持至 96 h。肝胰腺的 SOD 活性在 24 h 后下降, 并在 96 h 时恢复至正常水平。

高盐低碱胁迫下(图 6a~f), 前鳃组织的 GSH 浓度未观察到显著变化。后鳃组织的 GSH 浓度在 24 h 时上升, 至 96 h 虽有所回落, 但仍高于正常水平。肝胰腺的 GSH 浓度在 24 h 时下降, 96 h 时虽有所回升, 但仍未达到正常水平。前鳃组织的 SOD 活性在 24 h 时上升, 在 96 h 时回落, 但仍高

于正常水平。后鳃组织的 SOD 活性在此胁迫条件下未表现出显著变化。肝胰腺的 SOD 活性在 24 h 后下降, 并持续至 96 h。

低盐低碱胁迫下(图 6a~f), 前鳃组织的 GSH 浓度未观察到显著变化, 而后鳃组织的 GSH 浓度从 24 h 开始上升, 持续至 96 h。肝胰腺的 GSH 浓度在 24 h 时未显著变化, 但在 96 h 时有所下降。前鳃组织的 SOD 活性在 24 h 时未显著变化, 但在 96 h 时下降。后鳃组织的 SOD 活性在 24 h 时上升, 在 96 h 时回落, 但仍高于正常水平。肝胰腺的 SOD 活性在此胁迫条件下未表现出显著变化。

低盐高碱胁迫下(图 6a~f), 前鳃组织的 GSH 浓度随时间逐步上升, 后鳃组织的 GSH 浓度同样从 24 h 开始上升, 并维持至 96 h。肝胰腺的 GSH 浓度在 24 h 时下降, 但在 96 h 时回升至正常水

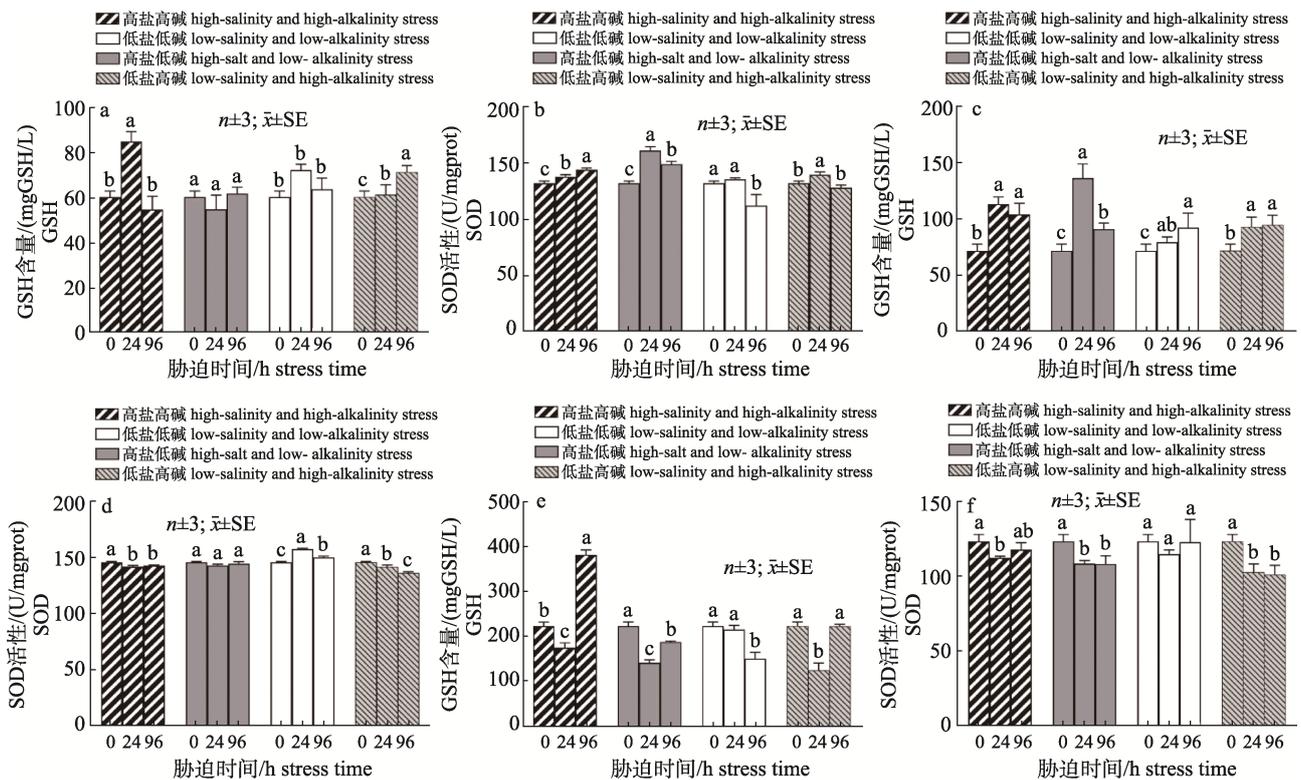


图 6 盐碱胁迫对中华绒螯蟹 GSH 浓度、SOD 酶活性的影响

a. 前鳃 GSH 含量; b. 前鳃 SOD 酶活性; c. 后鳃 GSH 含量; d. 后鳃 SOD 酶活性; e. 肝胰腺中 GSH 含量; f. 肝胰腺中 SOD 酶活性。上标不同小写字母表示同一处理组内不同时间点之间的显著差异(P<0.05)。

Fig. 6 The GSH and SOD enzyme activities of *Eriocheir sinensis* under saline-alkali stress

a. GSH concentration in anterior gills; b. SOD enzyme activity in anterior gills; c. GSH concentration in posterior gills; d. SOD enzyme activity in posterior gills; e. GSH concentration in hepatopancreas; f. SOD enzyme activity in hepatopancreas. Different small letters represent significant differences between different time points in the same stress group (P<0.05).

平。前鳃组织的 SOD 活性在 24 h 时上升, 在 96 h 时虽有所回落, 但仍高于正常水平。后鳃组织的 SOD 活性随时间逐步降低。肝胰腺的 SOD 活性在 24 h 后下降, 并维持至 96 h。

### 3 讨论

#### 3.1 黄河口中华绒螯蟹对盐度和碱度的耐受性

盐度和碱度是盐碱水环境中至关重要的理化参数, 显著影响水生动物的渗透压调节能力, 进而决定了水生生物对环境变化的适应性。因此, 开展针对水生动物盐碱耐受性的研究, 并阐明其耐盐碱的生理机制, 对于培育适应盐碱环境的水产养殖品种至关重要。本研究中, 黄河口中华绒螯蟹对盐度耐受能力高于中华小长臂虾(*Palaeomonetes sinensis*)<sup>[17]</sup>, 对碱度耐受能力也高于罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)<sup>[18]</sup>、凡纳滨对虾<sup>[19]</sup>、日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)<sup>[20]</sup>等耐盐碱甲壳动物, 表明黄河口中华绒螯蟹对氯化钠盐度和碳酸氢钠碱度具有较强耐受性。我国科研人员先后培育了经国家审查认定的 6 个中华绒螯蟹新品种, 但尚无源自黄河水系的新品种。与辽河水系中华绒螯蟹相比<sup>[21]</sup>, 黄河口中华绒螯蟹在盐度和碱度的耐受力上并无显著差异。因此, 以黄河口中华绒螯蟹为育种基础群体, 进一步选育出耐盐碱性状优良的新品种, 不仅科学上可行, 而且具有重要的实践价值。

#### 3.2 盐碱胁迫对黄河口中华绒螯蟹组织结构的影响

鳃作为水生动物进行气体交换和离子调节的关键器官, 其结构的完整性对生物体的健康至关重要。环境因子如盐度和碱度的波动会引起鳃结构的改变, 进而引起鳃组织出现器质性损伤, 影响水生动物的呼吸功能和渗透压调节。本研究中, 盐碱胁迫下中华绒螯蟹的前鳃和后鳃组织均出现鳃丝血腔增大、上皮层损伤、细胞溶解等现象, 表明盐度和碱度胁迫对中华绒螯蟹的鳃组织造成了损伤。这与罗氏沼虾<sup>[22]</sup>和莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)<sup>[23]</sup>在盐碱胁迫下鳃丝出现血管淤血、鳃小片弯曲以及上皮细胞脱落等现象类似。值得注意的是, 本研究首次分别对

中华绒螯蟹的前鳃和后鳃组织在盐碱胁迫下组织结构进行了详细观察, 发现在低盐度胁迫及盐碱交互胁迫条件下, 后鳃的损伤程度相对较轻。这种差异可能源于中华绒螯蟹的前鳃主要负责呼吸功能, 而后鳃则承担维持渗透压平衡和离子交换的功能<sup>[24]</sup>, 从而显示后鳃相比前鳃具有更强的盐碱耐受能力。

肝胰腺作为甲壳动物的关键器官, 其组织结构的变异往往是生物体适应环境变化的重要指标。本研究中, 盐度、碱度以及盐碱交互胁迫均会导致中华绒螯蟹肝胰腺组织中出现大量空泡和上皮细胞脱落, 表明高盐碱胁迫对肝胰腺组织造成了严重损害。这与日本沼虾<sup>[25]</sup>、中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)<sup>[26]</sup>在盐碱胁迫下肝胰腺中肝胰腺小管萎缩和变形, 引起出血等病理变化类似, 进一步强调了肝胰腺在环境胁迫下作为生物体适应性改变的敏感指标。

在盐碱胁迫下, 碳酸盐碱度胁迫对脊尾白虾鳃组织造成的损伤程度超过了由盐度引起的胁迫<sup>[27]</sup>。本研究中, 即使在安全浓度范围内, 单一的碱度胁迫相较于盐度胁迫, 对中华绒螯蟹的组织造成的损伤更为严重。此外, 在盐碱交互胁迫的条件下, 低盐高碱胁迫对鳃组织造成的损害比高盐低碱胁迫更为显著, 表明碱度的变化对中华绒螯蟹构成了更大的生理压力。进一步的观察显示, 在高盐高碱胁迫下, 前鳃、后鳃和肝胰腺组织的损伤程度显著高于低盐胁迫或低碱胁迫条件, 表明盐碱度交互胁迫对中华绒螯蟹的组织结构影响, 比单一环境因素的胁迫作用更为严重。

#### 3.3 盐碱胁迫对黄河口中华绒螯蟹抗氧化能力的影响

甲壳动物在面临环境胁迫时, 会触发体内的氧化应激反应, 导致大量活性氧(ROS)的产生。为了缓解氧化应激对机体的潜在损害, 机体将激活其抗氧化防御系统。SOD 作为抗氧化系统中的关键酶之一, 负责清除有害的活性氧, 减轻氧化损伤<sup>[28]</sup>。GSH 则是 GSH-Px 和 GST (谷胱甘肽转移酶)这两种过氧化物分解酶的重要底物, GSH-Px 通过催化 GSH 来消除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 而 GST 则催化氧化反应的中间产物与 GSH 结合, 从而被机体清除。

因此, GSH 的含量是评估机体抗氧化能力的重要指标<sup>[29]</sup>。本研究中, 中华绒螯蟹的前鳃和后鳃组织在盐度或者碱胁迫下, SOD 酶活性和 GSH 浓度在多数情况下呈现显著增加的趋势, 表明在盐碱胁迫下中华绒螯蟹激活抗氧化酶系统以抵御环境胁迫对机体造成的损害。在急性碳酸盐碱度胁迫下, 脊尾白虾鳃和肝胰腺中 SOD 酶活性急剧升高, 以适应外部环境的挑战<sup>[15]</sup>。在低盐胁迫条件下, 前鳃的 GSH 浓度在 24 h 后显著升高, 而后鳃的 GSH 浓度则在 48 h 后才出现显著增加, 这可能反映了不同组织对盐碱胁迫的耐受性和应激反应速率的差异。组织学观察结果证实, 长期暴露于盐碱胁迫环境中, 前鳃和后鳃组织遭受损伤, 这影响了相关的应激反应, 导致抗氧化酶活性下降。因此, 随着胁迫时间的延长, 组织中的 SOD 酶活性和 GSH 浓度呈现逐渐下降的趋势, 这与中华绒螯蟹在面对重金属和低 pH 胁迫时血清中抗氧化酶活力的变化趋势相似<sup>[30]</sup>。此外, 其他水生动物, 如暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)<sup>[31]</sup>和青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)<sup>[32]</sup>在盐碱胁迫下也展现出类似的抗氧化酶活力变化趋势。

本研究中, 在盐度、碱度以及盐碱交互胁迫的条件下, 中华绒螯蟹肝胰腺中的 SOD 酶活性普遍呈现下降趋势, 表明即使在安全浓度范围内, 肝胰腺在低盐度和低碱度胁迫下的 SOD 酶活性仍然遭受了抑制。这可能归因于氧化应激导致的大量自由基生成, 这些过量的自由基对肝胰腺的生理功能构成了压力, 破坏了细胞内的氧化还原平衡, 进而抑制了 SOD 酶活性的正常发挥。结合组织学观察结果, 肝胰腺在盐碱胁迫下出现了大量空泡形成和上皮细胞脱落等损伤迹象, 这进一步证实了盐碱胁迫对中华绒螯蟹肝胰腺造成的损伤相较于鳃组织更为严重, 研究结果表明在环境胁迫下, 肝胰腺作为主要的代谢和解毒器官, 在维持机体稳态中发挥重要作用。

本研究深入揭示了黄河口中华绒螯蟹对氯化钠盐度和碳酸氢钠碱度的显著耐受性, 从而突显了其作为耐盐碱新品种的育种潜力。研究发现, 黄河口中华绒螯蟹展现出对盐碱胁迫的复杂响应机制, 其抗氧化系统的激活与抑制呈现出动态变

化过程, 这可能与自由基的过量产生和抗氧化酶系统调节能力的饱和有关。此外, 研究还发现了不同组织的盐碱耐受性和抗氧化响应的差异性, 为理解中华绒螯蟹的生理适应性提供了新的视角。本研究不仅丰富了对中华绒螯蟹耐盐碱机制的认识, 也为黄河流域盐碱水养殖和育种实践提供了重要的理论依据。

#### 参考文献:

- [1] Li M S, Wang S H, Zhao Z G, et al. Effects of alkalinity on the antioxidant capacity, nonspecific immune response and tissue structure of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. *Fishes*, 2022, 7(4): 206.
- [2] Chen X Z, Lai Q F, Yao Z L, et al. Technical model of green saline-alkali aquaculture[J]. *China Fisheries*, 2020, 9: 61-63. [陈学洲, 来琦芳, 么宗利, 等. 盐碱水绿色养殖技术模式[J]. *中国水产*, 2020, 9: 61-63.]
- [3] Pine H J, Jescovitch L N, Roy L A, et al. Growth of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* cultured on inland low-salinity pond soils[J]. *North American Journal of Aquaculture*, 2018, 80(3): 273-277.
- [4] Khan U. Effects of salinity on brook trout (*Salvelinus fontinalis*) alevins growth[J]. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 2019, 4(2): 93-96.
- [5] Ningsih L, Sulmartiwi L, Lutfiyah L. The profile of *Carassius auratus* growth and hepatosomatic index in different salinity[J]. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2020, 441(1): 012114.
- [6] Wilkie M P, Wood C M. The adaptations of fish to extremely alkaline environments[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1996, 113(4): 665-673.
- [7] 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.
- [8] Zhang R, Zhao Z G, Li M S, et al. Effects of saline-alkali stress on the tissue structure, antioxidation, immunocompetence and metabolomics of *Eriocheir sinensis*[J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 871: 162109.
- [9] Su J Q, Zhu H P, Zhu C B, et al. Effects of salinity and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ratio on survival and histological structure of *Litopenaeus vannamei*[J]. *South China Fisheries Science*, 2021, 17(5): 45-53. [苏家齐, 祝华萍, 朱长波, 等. 盐度和钠离子/钾离子对凡纳滨对虾幼虾存活与组织结构的影响[J]. *南方水产科学*, 2021, 17(5): 45-53.]
- [10] Zhang Y, Sun K, Li Z Y, et al. Effects of acute diclofenac exposure on intestinal histology, antioxidant defense, and

- microbiota in freshwater crayfish (*Procambarus clarkii*)[J]. *Chemosphere*, 2021, 263: 128130.
- [11] Feng G P, Lu J, Zhuang P, et al. Effects of salinity on osmo-ionic regulation and enzyme activities in mature female *Eriocheir sinensis*[J]. *Marine Fisheries*, 2013, 35(4): 468-473. [冯广朋, 卢俊, 庄平, 等. 盐度对中华绒螯蟹雌性亲蟹渗透压调节和酶活性的影响[J]. *海洋渔业*, 2013, 35(4): 468-473.]
- [12] Zhao Y C, Wang R J, Shen M, et al. Effects of high-salt stress on daily weight gain, osmoregulation and immune related enzyme activities in *Litopenaeus vannamei* postlarvae[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(4): 833-840. [赵玉超, 王仁杰, 沈敏, 等. 高盐对凡纳滨对虾仔虾生长、渗透调节及免疫相关酶活性的影响[J]. *水产学报*, 2019, 43(4): 833-840.]
- [13] Pinto D, Pellegrin L, Nitz L F, et al. Haematological and oxidative stress responses in *Piaractus mesopotamicus* under temperature variations in water[J]. *Aquaculture Research*, 2019, 50(10): 3017-3027.
- [14] Mu W, Wang X, Wu X Y, et al. The optimal arginine requirement in diets for juvenile humpback grouper, *Cromileptes altivelis*[J]. *Aquaculture*, 2020, 514: 734509.
- [15] 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. [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.]
- [16] 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. [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.]
- [17] Bao J, Jiang H B, Fu P P, et al. Salinity tolerance of *Palaemonetes sinensis* and effects of salinity on its respiratory metabolism[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2018, 37(11): 3351-3356. [包杰, 姜宏波, 付佩佩, 等. 中华小长臂虾对盐度的耐受性及盐度对其呼吸代谢的影响[J]. *生态学杂志*, 2018, 37(11): 3351-3356.]
- [18] Wang G C, Zhang Z Q, Dong S L, et al. Studies of toxicity of NaCl and alkalinity to post-larval *M. rosenbergii*[J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 2001, 31(4): 523-528. [王桂春, 张兆琪, 董双林, 等. 氯化钠和碱度对罗氏沼虾仔虾的毒性研究[J]. *青岛海洋大学学报(自然科学版)*, 2001, 31(4): 523-528.]
- [19] Yang F Y, Sun L M, Yang X Q. Adaptability of whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* to carbonate saline-alkali inland water environment I. Adaptive capacity of desalinated juvenile shrimp to alkalinity[J]. *Fisheries Science and Technology Information*, 2004, 31(3): 99-101. [杨富亿, 孙丽敏, 杨欣乔. 南美白对虾对内陆碳酸盐型盐碱水环境的适应性研究\* I. 淡化幼虾对碱度的适应能力[J]. *水产科技情报*, 2004, 31(3): 99-101.]
- [20] Yang F Y, Li X J, Yang X Q. Adaptability of *Macrobrachium nipponense* juvenile to water alkalinity and pH[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2005, 40(6): 74-79. [杨富亿, 李秀军, 杨欣乔. 日本沼虾幼虾对碱度和 pH 的适应性[J]. *动物学杂志*, 2005, 40(6): 74-79.]
- [21] Yang Y H, Li M S, Luo L, et al. Study on toxicity of salinity and alkalinity on *Eriocheir sinensis*[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2022, 53(2): 36-41. [杨雨虹, 李明帅, 罗亮, 等. 盐碱胁迫对中华绒螯蟹毒性作用研究[J]. *东北农业大学学报*, 2022, 53(2): 36-41.]
- [22] Li L S. Effects of salinity on growth, molting and related metabolic enzyme activities of *Macrobrachium rosenbergii*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2022. [黎兰诗. 盐度对罗氏沼虾生长、蜕皮及相关代谢酶活性的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2022.]
- [23] Li Y Y. Histological and physiological biochemical response to saline-alkali stress and transcriptome analysis in *Oreochromis mossambicus*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2022. [李娅娅. 莫桑比克罗非鱼对盐碱胁迫的组织结构与生理生化响应和转录组分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2022.]
- [24] Péqueux A. Osmotic regulation in crustaceans[J]. *Journal of Crustacean Biology*, 1995, 15(1): 1-60.
- [25] Huang Y H. Effects of salinity on growth and physiology of oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*[D]. Shanghai: East China Normal University, 2021. [黄有辉. 盐度对日本沼虾生长生理的影响[D]. 上海: 华东师范大学, 2021.]
- [26] Zhou Y J. Effects of saline-alkali stress on growth, reproduction and immune function of *Fenneropenaeus chinensis*[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2023. [周玉洁. 盐碱胁迫对中国对虾生长、繁殖及免疫功能的影响[D]. 大连: 大连海洋大学, 2023.]
- [27] Zhang X H. Study on the effects of long-term saline-alkaline stress on the growth performance and ovarian development of *Exopalaemon carinicauda*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2023. [张秀红. 长期盐碱胁迫对脊尾白虾生长性能和卵巢发育的影响研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2023.]
- [28] Yuan M, Wang C L, Wang Y F, et al. Research progress of superoxide dismutase[J]. *Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2016, 25(6): 550-558. [袁牧, 王昌留, 王一斐, 等. 超氧化物歧化酶的研究进展[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2016, 25(6): 550-558.]
- [29] Srikanth K, Pereira E, Duarte A C, et al. Glutathione and its dependent enzymes' modulatory responses to toxic metals and metalloids in fish—a review[J]. *Environmental Science*

- and Pollution Research, 2013, 20(4): 2133-2149.
- [30] Yang Z G, Zhao X J, Cheng Y X. Effects of cadmium and low pH stress on immune response and expression of related genes in the Chinese Mitten Crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2022, 31(2): 373-383. [杨志刚, 赵雪健, 成永旭. 镉和低 pH 胁迫对中华绒螯蟹免疫应答及相关基因表达的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2022, 31(2): 373-383.]
- [31] Wang Z, Yao Z L, Lin T T, et al. Effects of carbonate alkalinity stress on SOD, ACP, and AKP activities in the liver and kidney of juvenile *Gymnocypris przewalskii*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(6): 1212-1218. [王卓, 么宗利, 林听听, 等. 碳酸盐碱度对青海湖裸鲤幼鱼肝和肾 SOD、ACP 和 AKP 酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 2013, 20(6): 1212-1218.]
- [32] Bian P J, Qiu C G, Xu S L, et al. Effects of salinity on growth, activity of non-specific immune and antioxidant enzymes in obscure puffer *Takifugu obscurus*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(1): 108-114. [边平江, 邱成功, 徐善良, 等. 盐度对暗纹东方鲀生长、非特异性免疫和抗氧化酶活力的影响[J]. 水生生物学报, 2014, 38(1): 108-114.]

## Effects of saline-alkali stress on the tissue structure and antioxidant capacity of *Eriocheir sinensis* in the Yellow River estuary

WANG Xiaofan, LIU Guotao, WANG Zhongkai, HAO Pengyuan, ZHANG Long, CHEN Yunxing, LI Yuquan

School of Marine Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China

**Abstract:** To investigate the physiological adaptability of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) to saline-alkali water environments from the Yellow River estuary, we constructed various gradients of salinity and alkalinity, as well as single-factor stress of salinity (14 and 35 mmol/L) and alkalinity (26 and 55 mmol/L) and combined saline-alkali stress (salinity, 6 and 14 mmol/L; alkalinity, 10 and 26 mmol/L). The crabs were subjected to a continuous saline-alkali stress treatment for 96 h. We examined the survival rate of *E. sinensis* under saline-alkali stress and the structural changes in the gill tissues (anterior and posterior) and hepatopancreas. Additionally, the activity of the antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD) and concentration of glutathione (GSH) in these tissues were measured. The results showed that *E. sinensis* from the Yellow River estuary had notable tolerance to sodium chloride salinity and sodium bicarbonate alkalinity. The lethal concentration 50 (LC<sub>50</sub>) values at 24, 48, 72, and 96 h were 65.90, 55.39, 53.29, and 50.14 mmol/L, respectively, with a safe concentration of 13.97 mmol/L. For alkalinity stress, the LC<sub>50</sub> values at 24, 48, 72, and 96 h were 119.4, 86.48, 64.49, and 58.98 mmol/L, respectively, with a safe concentration of 25.96 mmol/L. Histological assessments showed that under saline-alkali stress, the anterior gills suffered more damage than the posterior gills possibly because of their roles in maintaining osmotic balance and ion exchange; thus, the posterior gills showed stronger tolerance to saline-alkaline stress than the anterior gills. Moreover, alkalinity stress caused more severe damage at the tissue level than salinity stress; furthermore, the degree of damage caused by the saline-alkaline interactive stress further exceeded that of the damage caused by the individual stress factors. Under the continuous 96 h-saline-alkali stress, the SOD activity and GSH concentration in the anterior and posterior gills of *E. sinensis* first increased and then decreased. After 72 h, the SOD activity and GSH concentration significantly decreased to below the initial levels; the SOD activity in the hepatopancreas significantly decreased after 24 h. These results indicate that *E. sinensis* can activate its antioxidant system to adapt to saline-alkali stress; however, when the intensity of environmental stress exceeds the coping capacity of its antioxidant system, the activity of antioxidant enzymes is suppressed.

**Key words:** *Eriocheir sinensis*; the Yellow River estuary; salinity; alkalinity; stress; tolerance; antioxidant enzyme; saline-alkali water

**Corresponding author:** LI Yuquan. E-mail: jiangfangqian@163.com