

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.16056

低 pH 胁迫对克氏原螯虾鳃和肝胰腺酶活力及组织结构的影响

陶易凡^{1,2}, 强俊², 王辉³, 徐跑^{1,2}, 马昕羽¹, 赵文强¹

1. 南京农业大学 无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 农业部淡水渔业与种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081;

3. 淮阴师范学院 生命科学学院, 江苏 淮安 223300

摘要: 采用石蜡切片技术, 结合生物酶的测定, 以体重(25.88±4.40) g 的克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)为研究对象, 研究了低 pH 胁迫对克氏原螯虾鳃和肝胰腺生理代谢与组织结构的影响。在得出 96 h LC₅₀ 的基础上, 将克氏原螯虾暴露于半致死浓度 pH 水体中 96 h, 以 pH7.6 作为对照, 并于胁迫后 0 h、2 h、8 h、24 h、96 h 采集鳃和肝胰腺样品, 测定鳃部分代谢酶和肝胰腺主要抗氧化指标, 并对鳃和肝胰腺组织进行切片观察。实验结果表明, pH 96 h LC₅₀ 为 3.675。低 pH 暴露后, 实验组鳃 Na⁺-K⁺-ATP 酶和乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活力逐渐升高, 细胞色素氧化酶(cytochrome oxidase, COO)活力逐渐下降; 肝胰腺超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)活力呈现先上升后下降的变化趋势, 丙二醛(malondialdehyde, MDA)在肝胰腺中的累积量显著增加($P<0.05$)。切片结果表明, 低 pH 胁迫引起克氏原螯虾鳃组织中呼吸上皮细胞逐渐脱落, 角质层受损; 肝胰腺组织中 B 细胞及其内部转运泡体积增大, 转运泡内颗粒物质增多, 肝小管结构受损。研究表明, 低 pH 胁迫会对克氏原螯虾生理代谢产生影响, 并引起组织缺氧; 虾体氧化防御功能在胁迫前期被诱导激活, 但在胁迫后期受到一定抑制; 低 pH 胁迫可以引起克氏原螯虾鳃和肝胰腺组织结构损伤。

关键词: 克氏原螯虾; pH; 半致死浓度; 酶活; 组织切片; 急性胁迫

中图分类号: S944

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)06-1279-11

水体 pH 是水产养殖中重要的环境因子之一, 近年来由于酸雨和水污染加剧导致养殖水体 pH 波动较大。水体低 pH 作为胁迫因子会刺激养殖生物产生应激反应, 对机体调节和免疫防御产生压力^[1]。当这种刺激强度过大或持续时间过长时, 会使机体无法维持正常的调节机能, 体内代谢紊乱, 个体抗病力下降, 最终会影响到养殖生产的健康发展。目前, 已有一些研究表明, 低 pH 胁迫会对甲壳动物存活^[2]、代谢^[3]、免疫防御^[4-6]和抗氧化应激^[7]等方面造成影响。

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)隶属甲壳纲, 其原产于美国中南部和墨西哥北部, 20 世纪 30 年代引入中国, 目前克氏原螯虾在全国分布广泛,

是中国淡水虾类中的重要资源^[8]。由于其肉味鲜美、营养丰富, 深受广大消费者喜爱, 市场前景广阔。随着克氏原螯虾集约化养殖规模的扩大, 病害问题日趋严重, 养殖者逐渐意识到环境因子在克氏原螯虾健康养殖上发挥着重要的作用。然而, 有关环境因子对克氏原螯虾影响的研究还不够完善, 其中关于低 pH 胁迫对克氏原螯虾影响的研究较少, 仅见朱毅菲^[9]报道了关于低 pH 突变对克氏原螯虾免疫调节功能的影响以及郭春雨等^[10]对克氏原螯虾在酸性胁迫(pH 5.0)32 h 内鳃 Na⁺-K⁺-ATP 酶活力变化趋势的研究。尚未见低 pH 胁迫对克氏原螯虾抗氧化应激, 呼吸代谢以及组织结构变化影响的报道。

收稿日期: 2016-02-26; 修订日期: 2016-06-07.

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金(CX(14)2074).

作者简介: 陶易凡(1992-), 男, 博士研究生, 研究方向为水产动物繁殖生物学. E-mail: 552092749@qq.com

通信作者: 徐跑, 研究员. E-mail: xup@ffrc.cn

本研究首先通过实验确定了低 pH 胁迫下克氏原螯虾 96 h 半致死浓度, 分析半致死 pH 浓度下, 不同胁迫时间下鳃丝 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶、呼吸代谢酶[包括乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、细胞色素氧化酶(cytochrome oxidase, COO)]与肝胰腺抗氧化应激指标[包括超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)]的变化, 同时结合胁迫后肝胰腺和鳃的组织结构变化, 从生理和组织水平深入分析低 pH 胁迫对克氏原螯虾的影响, 旨在为其健康养殖以及养殖过程中的水质管理提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

实验用的克氏原螯虾由江苏省新大运生态农业开发有限公司提供。实验开始前将克氏原螯虾放入周转箱(规格为 75 cm×45 cm×55 cm)中暂养 7 d, 养殖水深 10 cm, 实验用水为经充分曝气 72 h 的自来水, 水温(24.70 ± 0.28) $^{\circ}\text{C}$, pH (7.76 ± 0.03), 全天充气增氧以保证水中溶氧充足。在周转箱内放入适量网片, 供克氏原螯虾栖居, 减少螯虾之间相互打斗。每天投喂小杂鱼碎块 2 次(8:00 和 17:00), 投喂量为虾体重的 3%~5%, 在投喂 2 h 后采用虹吸管吸出残饵与粪便并换水 1/3, 以保证水质清洁。选择附肢完整、活力强、规格相近的克氏原螯虾用于实验, 实验用虾体重(25.88 ± 4.40) g, 体长(7.16 ± 0.39) cm。

1.2 实验方法

1.2.1 96 h 半致死毒性实验 在低 pH 急性毒性实验开始前, 先通过预实验摸索浓度范围, 基本确定克氏原螯虾 96 h 全部死亡和 96 h 全部存活的 pH 值在 2~6。在此基础上开始正式 96 h 半致死毒性实验, 设置 5 个 pH 梯度: pH 2, 3, 4, 5 和 6。每组浓度设置 3 个平行, 每个平行放 10 尾虾。每日观察并记录克氏原螯虾的活动情况、中毒症状以及死亡数(用细玻璃棒触及克氏原螯虾腹部 5 min 内无反应即视为死亡^[11]), 及时捞出死虾, 各 pH 水体的水深均为 10 cm。pH 急性毒性实验期间, 正常投喂并在投喂结束 2 h 后清除残饵和粪便,

换水 1/2 并调至相应 pH 浓度, 其他环境条件与暂养时一致, 每隔 4 h 采用便携式 pH 计(梅特勒-托利多 FG2)检测水中 pH, 并用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 调节 pH, 确保其维持在设定的 pH 浓度。

1.2.2 低 pH 胁迫实验 依据急性低 pH 应激下克氏原螯虾 96 h 半致死浓度, 设置对照组(pH 7.6)和低 pH 实验组(pH 3.6), 两个 pH 浓度组各设 3 个平行。实验在 6 个周转箱中进行, 每个水箱中随机放入 30 尾克氏原螯虾, 对照组和低 pH 实验组水深均为 10 cm。pH 胁迫实验期间正常投喂并在投喂结束 2 h 后清除残饵和粪便, 换水 1/2 并调至相应 pH 浓度, 其他环境条件与暂养时一致, pH 的测定方式、测定间隔和调节方式与 pH 急性毒性实验时相同。

1.2.3 样品的采集与处理 在低 pH 胁迫实验期间, 分别于 0 h、2 h、8 h、24 h、96 h 采集样品, 每次从各水箱中随机选取 3 尾活体进行解剖, 剖取的鳃和肝胰腺组织用生理盐水漂洗后, 一部分放入 Bouin 氏液中固定; 剩余部分的鳃和肝胰腺组织用液氮速冻后, 放入 -70°C 冰箱中保存, 用于酶活的测定。

1.2.4 鳃和肝胰腺组织的石蜡切片制作 鳃和肝胰腺组织放入 Bouin 氏液中固定 24 h 后, 用乙醇逐级脱水, 石蜡包埋后切片, HE (hematoxylin-eosin)染色, 光学显微镜观察并拍照。

1.2.5 样品酶活的测定 鳃和肝胰腺样品解冻后, 用预冷生理盐水冲洗, 滤纸吸干水分后称取 0.1 g 左右组织样品, 加入 4 倍体积(W/V)预冷生理盐水研磨制成组织匀浆, 鳃 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶、LDH、COO, 肝胰腺 SOD、CAT 活力以及 MDA 的含量测定采用上海朗顿生物有限公司的 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)试剂盒, 按照试剂盒中的说明制备粗酶液。粗酶液置于 4°C 保存, 在 24 h 内测定完毕。实验结果通过 BioTek EonTM 微孔板分光光度计进行读数。

1.3 数据分析

实验采用 SPSS22.0 分析所得数据, 结果以平均数±标准误($\bar{x}\pm\text{SE}$)来表示。pH 胁迫下同一时间点对照组和实验组间的比较采用独立样本 *T* 检验来检测, 同一处理组不同时间点间的数据先采用

单因素方差分析(one-way ANOVA), 当差异显著时, 采用 Duncan's 进行多重比较。P<0.05 为差异显著水平。

2 结果与分析

2.1 克氏原螯虾 96 h pH 半致死浓度(LC₅₀)的测定

随着 pH 值的降低, 克氏原螯虾胁迫 96 h 的死亡率逐渐上升(表 1)。以 pH 浓度为自变量, 虾体死亡率为因变量, 计算得到回归方程为: $y = 148 - 26.667x$ ($R = 0.955$, $P < 0.0001$), 通过直线内插法求得克氏原螯虾 96 h pH 半致死浓度为 3.675。

表 1 不同 pH 胁迫对克氏原螯虾死亡率的影响
Tab. 1 Effect of different pH values on the mortality in *Procambarus clarkii*

| pH | 96 h 死亡数/尾 96 h motality/ind | | | 平均死亡率/% average mortality |
|----|------------------------------|----|-----|------------------------------|
| | I | II | III | |
| 2 | 10 | 10 | 10 | 100 ^a |
| 3 | 7 | 9 | 6 | 73.33 ^b |
| 4 | 2 | 3 | 3 | 26.67 ^c |
| 5 | 0 | 1 | 1 | 6.67 ^d |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 0 ^d |

注: 不同小写字母表示不同 pH 处理间死亡率存在差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: The different lowercase superscripts mean significant differences ($P < 0.05$) in mortality of different pH treatments.

2.2 低 pH 胁迫对克氏原螯虾鳃 Na⁺-K⁺-ATP 酶活力的影响

由图 1 可知, 随着低 pH 胁迫时间的延长, 实验组克氏原螯虾鳃 Na⁺-K⁺-ATP 酶活力呈升高趋势, 胁迫 2 h 时, 实验组 Na⁺-K⁺-ATP 酶活力与对照组差异不显著($P > 0.05$)。随后, 实验组 Na⁺-K⁺-ATP 酶活力迅速升高, 并于胁迫 8 h 开始显著高于对照组($P < 0.05$)。

2.3 低 pH 胁迫对克氏原螯虾鳃 LDH 和 COO 活力的影响

由图 2 可知, 低 pH 胁迫后实验组克氏原螯虾鳃 LDH 活力迅速上升。胁迫 2 h 时, 实验组 LDH 活力显著高于对照组($P < 0.05$); 随着胁迫时间的延长, 实验组 LDH 活力继续上升, 但上升幅度不大 ($P > 0.05$); 胁迫 96 h 时, 实验组 LDH 活力达到最大值。

由图 3 可知, 低 pH 胁迫后实验组克氏原螯虾

鳃 COO 活力的变化与鳃 LDH 活力变化相反, 呈下降趋势。胁迫 2 h 时, 实验组 COO 活力与对照组差异不显著($P > 0.05$); 胁迫 8 h 后, 实验组 COO 活力与对照组相比差异显著($P < 0.05$); 随后, 实验组 COO 活力继续下降, 至胁迫 96 h 时, 实验组 COO 活力下降到最小值, 并且其与胁迫 2 h 时实验组 COO 活力存在显著差异($P < 0.05$)。

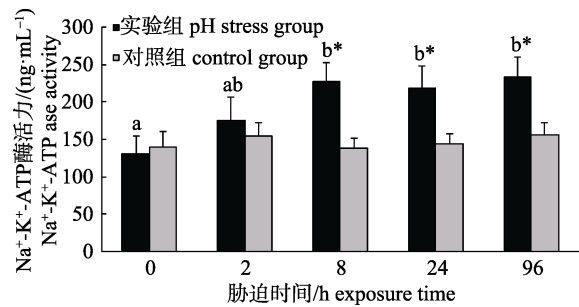


图 1 低 pH 胁迫对克氏原螯虾鳃 Na⁺-K⁺-ATP 酶活力的影响

不同小写字母表示同一处理不同时间点之间差异显著 ($P < 0.05$)。 “*” 表示实验组和对照组在胁迫后同一时间点差异显著 ($P < 0.05$)。实验组 pH 3.6, 对照组 pH 7.6。

Fig. 1 Effect of low-pH stress on Na⁺-K⁺-ATPase activity in gill of *Procambarus clarkii*

The different lowercase superscripts mean significant differences ($P < 0.05$) within the same treatment among different times; “*” means significant differences ($P < 0.05$) between pH stress group and the control group at the same time. pH stress group: pH 3.6; control group: pH 7.6.

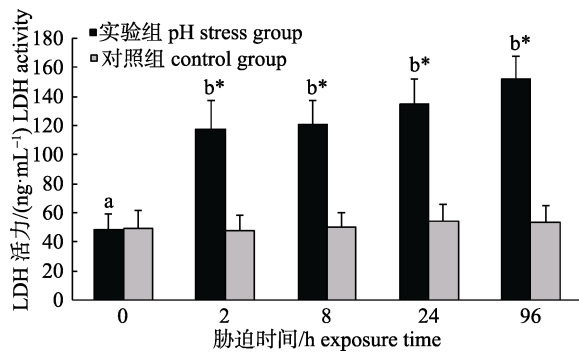


图 2 低 pH 胁迫对克氏原螯虾鳃 LDH 活力的影响
不同小写字母表示同一处理不同时间点之间差异显著 ($P < 0.05$)。 “*” 表示实验组和对照组在胁迫后同一时间点差异显著 ($P < 0.05$)。实验组 pH 3.6, 对照组 pH 7.6。

Fig. 2 Effect of low-pH stress on LDH activity in gill of *Procambarus clarkii*

The different lowercase superscripts mean significant differences ($P < 0.05$) within the same treatment among different times; “*” means significant differences ($P < 0.05$) between pH stress group and the control group at the same time. pH stress group: pH 3.6; control group: pH 7.6.

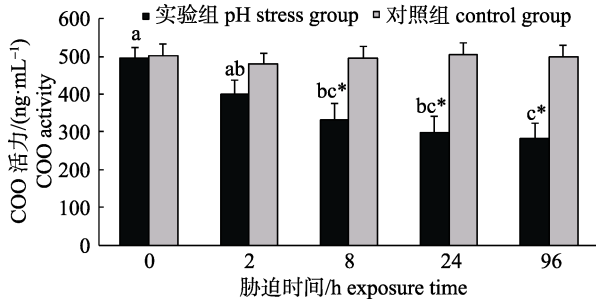


图 3 低 pH 胁迫对克氏原螯虾鳃 COO 活力的影响
不同小写字母表示同一处理不同时间点之间差异显著 ($P<0.05$). “*”表示实验组和对照组在胁迫后同一时间点差异显著 ($P<0.05$). 实验组 pH 3.6, 对照组 pH 7.6.

Fig. 3 Effect of low-pH stress on COO activity in gill of *Procamburus clarkii*

The different lowercase superscripts mean significant differences ($P<0.05$) within the same treatment among different times; “*” means significant differences ($P<0.05$) between pH stress group and the control group at the same time. pH stress group: pH 3.6; control group: pH 7.6.

2.4 低 pH 胁迫对克氏原螯虾肝胰腺抗氧化能力的影响

由图 4 可知,随着低 pH 胁迫时间的延长,实验组克氏原螯虾肝胰腺 SOD 活力呈先升高后降低的变化趋势。胁迫 2 h 时,实验组 SOD 活力与对照组相比差异显著 ($P<0.05$);胁迫 8 h 时,实验组 SOD 活力达到最大值,随后便开始逐渐下降;胁迫至 96 h,实验组 SOD 活力已显著低于对照组 ($P<0.05$)。

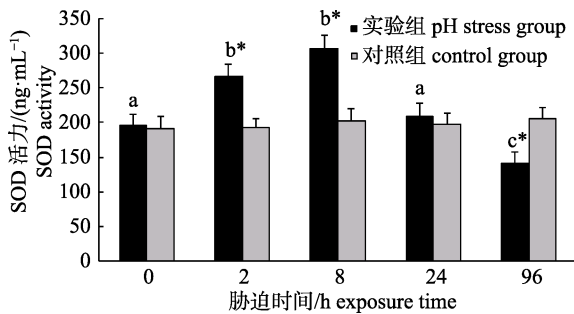


图 4 低 pH 胁迫对克氏原螯虾肝胰腺 SOD 活力的影响
不同小写字母表示同一处理不同时间点之间差异显著 ($P<0.05$). “*”表示实验组和对照组在胁迫后同一时间点差异显著 ($P<0.05$). 实验组 pH 3.6, 对照组 pH 7.6.

Fig. 4 Effect of low-pH stress on SOD activity in hepatopancreas of *Procamburus clarkia*

The different lowercase superscripts mean significant differences ($P<0.05$) within the same treatment among different times; “*” means significant differences ($P<0.05$) between pH stress group and the control group at the same time. pH stress group: pH 3.6; control group: pH 7.6.

由图 5 可知,随着低 pH 胁迫时间的延长,实验组克氏原螯虾肝胰腺 CAT 活力也呈现先升高后降低的变化趋势,但是其变化规律与肝胰腺 SOD 并不同步。胁迫 2 h 时,实验组 CAT 活力与对照组差异不显著 ($P>0.05$);随后,实验组 CAT 活力迅速升高,并于胁迫 8 h 开始显著高于对照组 ($P<0.05$);胁迫 24 h 后,实验组 CAT 活力开始下降,至胁迫 96 h,实验组 CAT 活力与对照组差异不显著 ($P>0.05$)。

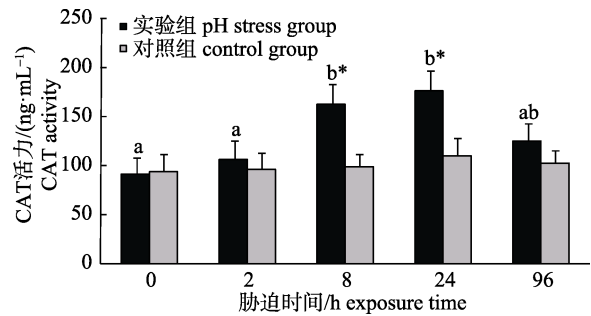


图 5 低 pH 胁迫对克氏原螯虾肝胰腺 CAT 活力的影响
不同小写字母表示同一处理不同时间点之间差异显著 ($P<0.05$). “*”表示实验组和对照组在胁迫后同一时间点差异显著 ($P<0.05$). 实验组 pH 3.6, 对照组 pH 7.6.

Fig. 5 Effect of low-pH stress on CAT activity in hepatopancreas of *Procamburus clarkii*

The different lowercase superscripts mean significant differences ($P<0.05$) within the same treatment among different times; “*” means significant differences ($P<0.05$) between pH stress group and the control group at the same time. pH stress group: pH 3.6; control group: pH 7.6.

由图 6 可知,随着低 pH 胁迫时间的延长,实验组克氏原螯虾肝胰腺 MDA 的含量呈逐渐上升的变化趋势。胁迫 2 h 时,实验组和对照组 MDA 含量无明显差异 ($P>0.05$);胁迫 8 h 时,实验组 MDA 的含量显著高于对照组 ($P<0.05$);至胁迫 96 h,实验组 MDA 的含量达到最大值,并显著高于胁迫 8 h 和 24 h 时实验组 MDA 的含量 ($P<0.05$)。

2.5 低 pH 胁迫对克氏原螯虾鳃组织结构的的影响

胁迫 0 h(对照)时,克氏原螯虾鳃叶结构完整,外部角质层光滑平整,内部呼吸上皮细胞排列整齐,细胞结构正常,由呼吸上皮细胞围成微血管,微血管内可见血细胞(图版 I-1);低 pH 胁迫 2~8 h 时,鳃腔内呼吸上皮细胞紧贴角质层,呼吸上皮细胞间隙有所增加,鳃叶结构较为正常(图版 I-2,

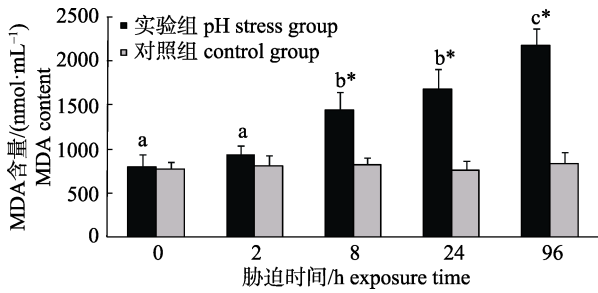


图 6 低 pH 胁迫对克氏原螯虾肝胰腺 MDA 含量的影响
不同小写字母表示同一处理不同时间点之间差异显著 ($P<0.05$). “*”表示实验组和对照组在胁迫后同一时间点差异显著 ($P<0.05$). 实验组 pH 3.6, 对照组 pH 7.6.

Fig. 6 Effect of low-pH stress on MDA in hepatopancreas of *Procambarus clarkii*

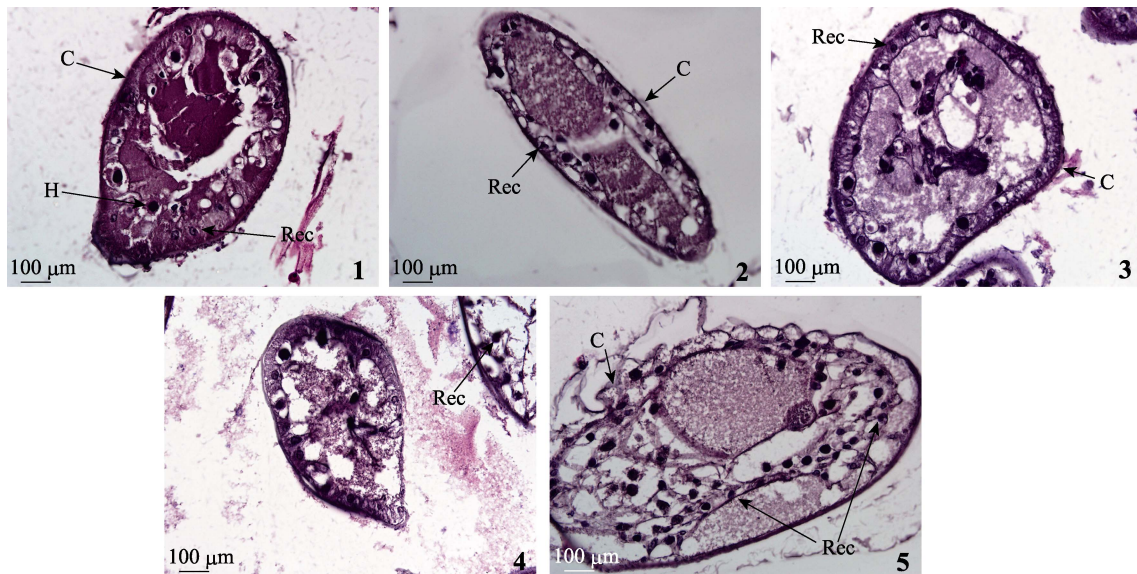
The different lowercase superscripts mean significant differences ($P<0.05$) within the same treatment among different times; “*” means significant differences ($P<0.05$) between pH stress group and the control group at the same time. pH stress group: pH 3.6; control group: pH 7.6.

图版 I-3); 低 pH 胁迫 24 h 时, 部分呼吸上皮细胞与角质层分离, 脱落进入微血管(图版 I-4); 低 pH

胁迫 96 h 时, 鳃叶与对照组相比体积明显增大, 局部角质层受损, 大部分呼吸上皮细胞从角质层脱落, 鳃叶正常结构遭到破坏(图版 I-5)。

2.6 低 pH 胁迫对克氏原螯虾肝胰腺组织结构的影响

胁迫 0 h(对照)时, 克氏原螯虾肝胰腺小管基膜完整, 管腔呈星型, 肝细胞结构正常、分布均匀(图版 II-1); 低 pH 胁迫 2 h 时, 肝小管结构相对正常, 管腔呈星型, B 细胞和 R 细胞分布均匀, 部分 B 细胞体积增大(图版 II-2); 低 pH 胁迫 8 h 时, B 细胞及其内部转运泡体积明显增大, 部分转运泡内出现颗粒物(图版 II-3); 低 pH 胁迫 24 h 时, 转运泡内的颗粒物明显增加, 由于转运泡体积的增大而导致肝小管的形态结构发生变化, 管腔被挤压变形, 细胞排列紊乱(图版 II-4); 低 pH 胁迫 96 h 时, R 细胞数量与对照组相比并未出现明显减少, 但体积增大的转运泡数量进一步增加,

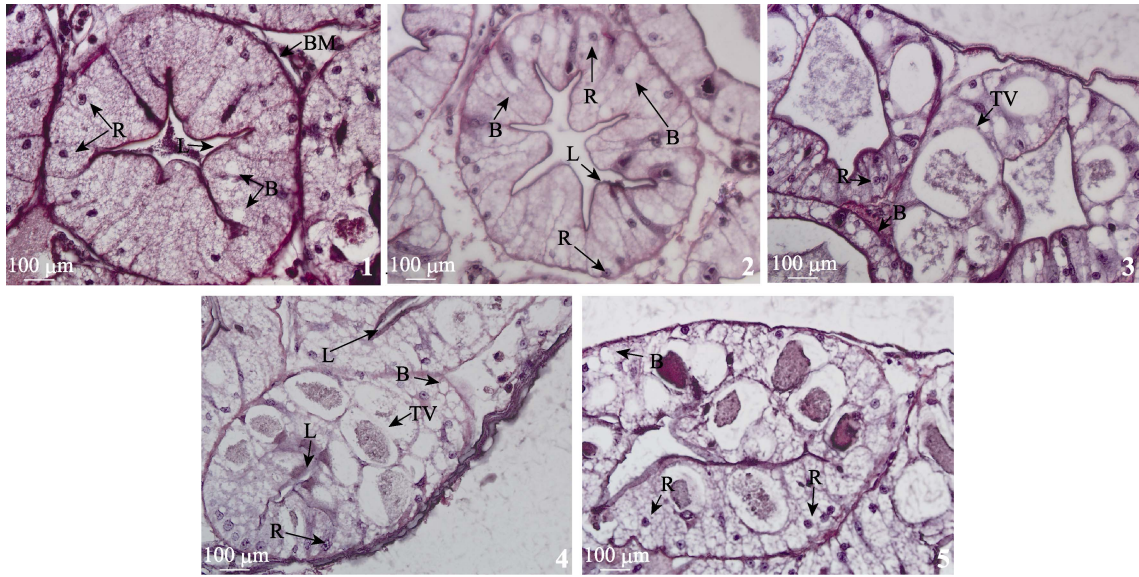


图版 I 低 pH 胁迫对克氏原螯虾鳃显微结构的影响(HE)

1. 低 pH (pH 3.6)胁迫 0 h(对照组)鳃叶, 示角质层(C)、血细胞(H)和呼吸上皮细胞(Rec); 2~3. 低 pH 分别胁迫 2 h、8 h 鳃叶, 示呼吸上皮细胞间隙有所增加; 4. 低 pH 胁迫 24 h 鳃叶, 示部分呼吸上皮细胞出现脱落; 5. 低 pH 胁迫 96 h 鳃叶, 示局部角质层受损, 呼吸上皮细胞大面积脱落。

Plate I Effect of low-pH stress on the gill microstructure of *Procambarus clarkii* (HE)

1. The gill microstructure of *Procambarus clarkii* exposed to low pH (pH 3.6) at 0 h (control group), showing cuticle (C), haemocytes (H) and respiratory epithelium cells (Rec); 2~3. The gill microstructure of *Procambarus clarkii* exposed to low pH at 2 h, 8 h, respectively, showing intercellular space of respiratory epithelium cells was increased; 4. The gill microstructure of *Procambarus clarkii* exposed to low pH at 24 h, showing part of the respiratory epithelium cells was exfoliated; 5. The gill microstructure of *Procambarus clarkii* exposed to low pH at 96 h, showing cuticle was impaired partly, and most of respiratory epithelium cells was exfoliated.



图版 II 低 pH 胁迫对克氏原螯虾肝胰腺显微结构的影响(HE)

1. 低 pH (pH 3.6) 胁迫 0 h (对照组) 肝胰腺小管, 示 B 细胞(B), R 细胞(R), 基膜(BM)和管腔(L);
2. 低 pH 胁迫 2 h 肝胰腺小管, 示部分 B 细胞体积增大;
3. 低 pH 胁迫 8 h 肝胰腺小管, 示 B 细胞及其内部转运泡体积明显增大, 部分转运泡内出现颗粒物质;
4. 低 pH 胁迫 24 h 肝胰腺小管, 示管腔变型, 转运泡体积增大, 细胞排列紊乱;
5. 低 pH 胁迫 96 h 肝胰腺小管, 示体积增大, 转运泡数量增加, 转运泡内颗粒物质增多。

Plate II Effect of low-pH stress on the hepatopancreas microstructure of *Procambarus clarkii* (HE)

1. The hepatopancreas microstructure of *Procambarus clarkii* exposed to low pH (pH 3.6) at 0 h (control group), showing B cells (B), R cells (R), basement membranes (BM), and lumen (L);
2. The hepatopancreas microstructure of *Procambarus clarkii* exposed to low pH at 2 h, showing the size of B cells was enlarged partly;
3. The hepatopancreas microstructure of *Procambarus clarkii* exposed to low pH at 8 h, showing the size of B cells and internal transferred vacuoles was increased significantly, and granular materials were appeared in some transferred vacuoles;
4. The hepatopancreas microstructure of *Procambarus clarkii* exposed to low pH at 24 h, showing lumen variant, the enlarged-size transferred vacuoles, and irregular-arranged cells;
5. The hepatopancreas microstructure of *Procambarus clarkii* exposed to low pH at 96 h, showing the enlarged size and increased number of transferred vacuoles, and the number of granular materials in transferred vacuoles was increased.

转运泡内颗粒物质继续增多, 肝小管正常的形态结构遭到破坏(图版 II-5)。

3 讨论

3.1 低 pH 胁迫对克氏原螯虾的急性毒性效应

pH 是衡量养殖水体水质的重要指标, 水体 pH 过低会直接或间接影响养殖生物的生长繁殖, 甚至造成养殖生物的死亡^[12]。不同虾类对 pH 胁迫的耐受程度存在明显差异。日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)幼虾^[2]的 96 h LC₅₀ 为 4.48, 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[13]幼虾的 96 h LC₅₀ 为 4.04, 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)^[14]的 96 h LC₅₀ 为 4.78。而本研究中克氏原螯虾在 pH 胁迫 96 h 后的 LC₅₀ 为 3.67, 其对低 pH 胁迫的耐受性要优于日本沼虾幼虾、凡纳滨对虾幼虾和脊尾白虾。然而, Morgan 等^[15]曾在 1982

年对克氏原螯虾和罗洛斯锈斑螯虾(*Orconectes rusticus*)耐酸性进行测定, 96 h LC₅₀ 分别为 2.8 和 2.6, 其测定结果低于本实验结果, 这可能与克氏原螯虾品种、规格及测定环境条件不同有关。克氏原螯虾自引入中国后, 经过多代繁殖和选育, 其耐酸性可能发生了一些变化; 同时, 测定环境条件不同也对克氏原螯虾胁迫后死亡率有着一定影响。研究表明, 克氏原螯虾在 4~25℃ 条件下, 环境温度越低, 心率越小, 代谢率越小, 死亡率越低^[16]。本研究环境温度为 25℃, 与 Morgan 等^[15]实验时的环境温度 15℃ 有较大差别, 这可能也是本研究在 pH 胁迫后死亡率较高的原因之一。

3.2 低 pH 胁迫对克氏原螯虾鳃组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶活力的影响

Na⁺-K⁺-ATP 酶广泛存在于生物的细胞膜上, 它通过水解 ATP 参与细胞膜两侧 Na⁺、K⁺离子的

跨膜主动运输, 在机体离子交换、能量代谢等方面发挥重要的作用^[17]。 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶对环境因子的变化较为敏感, 研究表明外界 pH 的变化会对甲壳动物鳃 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活力产生影响。潘鲁青等^[18]报道了凡纳滨对虾鳃丝 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活力随 pH 胁迫时间的延长呈峰值变化, 并在胁迫 3 d 后趋于稳定; 赵先银等^[19]也有类似的研究结果, 这表明当 pH 突变未超出甲壳动物渗透调节适应能力范围时, 甲壳动物会在短时间内提高 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活力, 促进能量代谢, 提高离子转运能力, 和鳃组织上的 Na^+/H^+ 、 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交换系统等协同维持体内 pH 的稳定。本研究中, 克氏原螯虾鳃 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶在胁迫 8 h 时活力迅速上升, 说明在面对 pH 刺激时, 克氏原螯虾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。然而胁迫后期克氏原螯虾鳃 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶仍然维持在一个较高的水平, 这可能是由于本次研究中 pH 刺激的强度较大, 造成鳃组织离子通透性异常, 较高水平的 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活力, 有助于维持鳃的离子平衡。郭春雨等^[10]对较大规格(体长 $9.0\text{ cm}\pm 0.5\text{ cm}$)的克氏原螯虾进行 32 h 低 pH 胁迫后, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶在短时间内下降, 然后上升至接近对照组水平。较大规格克氏原螯虾与小规格的相比, 其生理代谢可能存在一定差异。

3.3 低 pH 胁迫对克氏原螯虾鳃组织 LDH 和 COO 活力的影响

水体 pH 突变会对甲壳动物呼吸产生影响, 当水体 pH 不适宜甲壳动物生存时, 甲壳动物呼吸活动受到抑制, 耗氧率下降^[20]。Savant 等^[21]研究发现, 水中 pH 在 5.56~7.56 时, 泥蟹(*Ilyoplax gangetica*)耗氧率没有明显变化; 而水中 pH 低于 5.56 时, 其耗氧率出现明显下降。耗氧率的下降使甲壳动物机体内组织供氧受到影响, 呼吸代谢作用发生改变。LDH 和 COO 是机体糖代谢过程中的重要酶类, COO 位于线粒体内膜上, 通过将有氧代谢产生的电子传递给氧, 催化氧分子还原成水分子并产生 ATP, 是有氧代谢的限速酶^[22]。本研究中, 克氏原螯虾鳃 COO 活力随着 pH 胁迫时间的延长而呈现明显的下降趋势, 说明低 pH 胁迫使得克氏原螯虾有氧呼吸受到抑制, 由于组

织缺氧导致其有氧代谢能力下降; LDH 催化丙酮酸和乳酸的相互转化, 是机体无氧代谢的标志酶^[23]。本研究中, 克氏原螯虾鳃 LDH 活力随着 pH 胁迫时间的延长而呈现明显的上升趋势, 说明克氏原螯虾在高浓度 pH 胁迫有氧代谢受阻的情况下, 迅速提高了无氧代谢水平来满足缺氧条件下自身的能量需求。类似的呼吸代谢变化在光照胁迫试验^[24]中也有发生。三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)在高强度(3500 lx)的胁迫条件下, 有氧代谢会受到抑制, 机体通过提高 LDH 活力促进无氧代谢, 从而为机体供能。在本研究中, 克氏原螯虾鳃 LDH 和 COO 活力随胁迫时间的延长出现了相反的变化趋势, 一定程度上说明了虾体呼吸代谢的方式在酸性胁迫后由有氧代谢向无氧代谢转变。水体 pH 的突然降低可能对克氏原螯虾的呼吸活动产生影响, 呼吸代谢方式的转变可能有助于克氏原螯虾适应呼吸活动变化, 维持虾体内的能量代谢水平。

3.4 低 pH 胁迫对克氏原螯虾肝胰腺抗氧化能力的影响

在正常的生理状态下, 机体代谢产生的活性氧能够被抗氧化系统及时地清除。当生物体受到环境胁迫时, 机体内会产生大量的活性氧自由基, 若这些氧自由基未能被抗氧化系统及时清除, 则会对机体造成氧化损伤^[25]。SOD 和 CAT 是机体抗氧化防御的关键酶^[26], SOD 能够将 O_2^- 歧化为 H_2O_2 和 H_2O , CAT 能够将 SOD 作用产物 H_2O_2 还原成 H_2O , 因此通过体内 SOD 和 CAT 的作用能够减轻 O_2^- 对细胞造成的氧化伤害。在本研究中, 虾肝胰腺 SOD 和 CAT 活力在胁迫后 2~8 h 迅速升高, 这可能是由于环境 pH 的突变诱导克氏原螯虾体内活性氧自由基的激增, 虾体反馈性地提高了机体内抗氧化酶活力, 清除体内产生的过多氧自由基, 胁迫 24 h 后, 虾肝胰腺 SOD 和 CAT 活力开始出现回落。胁迫 96 h 时, 实验组 SOD 活力显著低于对照组。这与于天基等^[14]对脊尾白虾研究中抗氧化酶活力的变化有所不同, 可能是由于不同虾体对 pH 刺激的适应能力存在差异, 脊尾白虾在 pH 6.5 (96 h LC_{50} 4.78) 的低强度胁迫下, 可以通过短时间激活抗氧化系统来清除体内过多

活性氧自由基; 而本研究中, 克氏原螯虾在半致死 pH 胁迫下, 可能由于体内活性氧自由基过度积累, 超出了抗氧化系统的清理能力, 对细胞造成了氧化损伤, 而导致抗氧化系统的功能受到抑制。王芸等^[27]也发现, 较长时间的 pH 胁迫会对中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)抗氧化系统产生抑制。另外, 本研究中, 实验组 SOD 和 CAT 对 pH 胁迫的响应速度存在不同步性, SOD 在 pH 胁迫 2 h 后迅速升高, 24 h 后活性下降; CAT 则在 pH 胁迫 8 h 后逐渐上升, 96 h 时其活性降低。这可能是它们在抗氧化防御中功能不同所造成的。pH 胁迫初期, SOD 活力升高将氧自由基歧化成 H_2O_2 , 随后 CAT 活力升高, 进一步还原 SOD 的产物, 从而应对 pH 胁迫产生的氧化应激。MDA 是氧自由基作用于脂质发生过氧化反应的终产物^[28], 它的含量可以反映脂质过氧化反应的水平, 间接反映体内活性氧的积累情况。本研究中, 实验组肝胰腺 MDA 的含量在胁迫 2 h 时未出现明显变化, 说明抗氧化系统在此时能够对生成的氧自由基进行及时清除, 脂质过氧化反应的水平较低。随胁迫时间的延长, 实验组肝胰腺 MDA 的含量较对照组出现明显增加, 说明虾体内氧自由基可能由于 pH 胁迫而激增或由于 pH 胁迫使抗氧化系统的功能受抑制而导致其未能被及时清理, 在虾体内不断积累, 使得脂质过氧化反应加剧, 导致实验组肝胰腺 MDA 含量增加。

3.5 低 pH 胁迫对克氏原螯虾鳃组织结构的影响

鳃是甲壳动物进行气体交换和离子调节的重要器官, 通常由鳃轴和鳃叶两部分组成。鳃叶是最基本的功能单位, 其由角质层、呼吸上皮和微血管组成。由于鳃在发挥生理功能时与外界水环境直接接触, 一些不利的环境因子(盐度^[29]、重金属^[30])易对鳃组织造成损伤, 影响甲壳动物的呼吸功能和渗透调节作用。韩晓琳等^[29]研究表明低盐度胁迫会使三疣梭子蟹鳃丝不规则增厚, 血管增大, 血细胞增多, 上皮层破坏甚至解体。克氏原螯虾在受到慢性硫酸锌胁迫^[30]后, 会出现鳃叶肿大, 鳃膜和呼吸上皮细胞分离, 呼吸上皮细胞坏死、脱落的现象。在本研究中, 胁迫未开始时, 克氏原螯虾鳃叶结构清晰, 上皮细胞正常; 胁迫 24 h

时, 克氏原螯虾鳃叶内少量呼吸上皮细胞从角质层上脱落; 至胁迫 96 h 时, 克氏原螯虾鳃腔增大, 大部分呼吸上皮细胞脱落, 鳃结构受损严重, 这说明酸胁迫也会对克氏原螯虾鳃造成损伤。当鳃组织的结构受损时, 其正常生理功能的发挥就会受到影响, 呼吸上皮细胞的脱落使其气体交换的能力减弱, 易造成组织缺氧。本研究中, 低 pH 胁迫 96 h 时, 克氏原螯虾鳃丝上大部分呼吸上皮细胞脱落, 而此时有氧代谢酶 COO 和无氧代谢酶 LDH 活力分别处于最低值和最高值, 这说明了胁迫后期, 鳃组织的损伤可能导致了克氏原螯虾获氧能力的下降, 鳃组织缺氧造成有氧代谢减弱, 无氧代谢增强。

3.6 低 pH 胁迫对克氏原螯虾肝胰腺组织结构的影响

肝胰腺是甲壳动物的重要器官, 其发挥着类似于脊椎动物肝、胰脏和肠道等的功能^[31]。在肝胰腺中, 肝胰腺小管是其结构和功能的基本单位。肝小管内常见 4 种细胞, 即分泌细胞(B 细胞)、存储细胞(R 细胞)、纤维细胞(F 细胞)和胚细胞(E 细胞), 其中 B 细胞和 R 细胞数量较多。本研究发现, 低 pH 胁迫会引起克氏原螯虾肝胰腺内 B 细胞的转运泡体积增大, 数量增多, 并对肝小管的结构造成一定的损伤。已有研究表明, 环境变化可能会引起甲壳动物肝胰腺中细胞组成比例发生适应性变化, 特别是 B 细胞和 R 细胞^[29, 32-33]。三疣梭子蟹^[29]在低盐度(盐度 9.0)下暴露 72 h 后出现了 R 细胞减少, B 细胞内转运泡数量增多, 体积增大, 肝细胞中的空泡增多的现象。中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)在氨氮胁迫^[32]和饲喂添加组织胺(4000 mg/kg)的饲料^[33]后也出现了 B 细胞内空泡增多的现象。这些与本研究的结果具有一定的相似性。B 细胞不仅具有分泌功能, 还具有消化吸收营养物质的作用。甲壳动物在环境胁迫条件下, 会降低自身活动水平并且将储存的营养物质更多地用于维持机体基本生理代谢^[34]。B 细胞及其内部转运泡增多, 体积增大, 可能有助于肝小管内营养物质的代谢吸收^[35]。本研究中, 外界 pH 骤变的刺激使克氏原螯虾可能需要更多的营养物质来维持基本生理代谢, 而 B 细胞及其内部转运

泡增多、体积增大促进了代谢吸收, 有助于为其提供更多的能量。R 细胞的主要功能是储存营养物质, 韩晓琳等^[29]发现低盐胁迫时, 三疣梭子蟹通过消耗自身储存的营养物质来进行渗透压调节, 可能导致发挥储存功能的 R 细胞数量减少; 而本研究胁迫后期 R 细胞的数量未出现明显减少, 这可能是由于实验期间正常投饵, 克氏原螯虾从外界摄取了少量食物, 从而没有过多动用自身储存的营养物质。另外, 本研究中胁迫 8 h 后转运泡内开始出现颗粒物质, 并且随着胁迫时间的延长, 转运泡内的颗粒物质的数量有所增加。这些颗粒物质可能是营养代谢产物, 然而洪美玲等^[32]在氨氮胁迫实验中提出了另一种可能性, 她认为中华绒螯蟹肝胰腺中增大转运泡内的这些颗粒可能是含有氨氮的物质, 通过将其转运到体外可能可以缓解部分氨氮毒性。因此本研究中转运泡内出现的颗粒物质成分还有待进一步确认。但是, 通过本研究可以看出低 pH 胁迫对克氏原螯虾肝胰腺小管形态结构造成了损伤, 并且影响到了肝胰腺内的正常分泌和代谢活动。肝胰腺作为克氏原螯虾重要的消化和代谢器官, 胁迫后期组织结构损伤可能会引起肝胰腺代谢功能紊乱, 进而可能导致其应激死亡。

参考文献:

- [1] Le Moullac G, Haffner P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea[J]. *Aquaculture*, 2000, 191(1-3): 121-131.
- [2] 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.]
- [3] Wang W N, Wang A L, Chen L, et al. Effects of pH on survival, phosphorus concentration, adenylate energy charge and $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase activities of *Penaeus chinensis* Osbeck juveniles[J]. *Aquat Toxicol*, 2002, 60(1-2): 75-83.
- [4] 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 Immunol*, 2008, 25(6): 701-709.
- [5] Zhao X Y, Li J, Li J T, et al. Effects of pH stress on non-specific immune factors and RNA/DNA ratio of *Macrobrachium japonicum*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(1): 60-66. [赵先银, 李健, 李吉涛, 等. pH 胁迫对日本对虾非特异性免疫因子及 RNA/DNA 比值的影响[J]. *渔业科学进展*, 2011, 32(1): 60-66.]
- [6] Sun H, Li Y, Wang Y, et al. Effects of pH stress on five non-specific immune parameters of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. *Freshwater Fisheries*, 2011, 41(4): 70-74. [孙汉, 李义, 王玥, 等. pH 胁迫对中华绒螯蟹 5 种非特异性免疫指标的影响[J]. *淡水渔业*, 2011, 41(4): 70-74.]
- [7] Wang W N, Zhou J, Wang P, et al. Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme gene expression in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* when exposed to acute pH stress[J]. *Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol*, 2009, 150(4): 428-435.
- [8] Wang S C. Biology and ecological culture system of *Procambarus clarkii*[J]. *Freshwater Fisheries*, 2003, 33(4): 59-61. [王顺昌. 克氏螯虾的生物学和生态养殖模式[J]. *淡水渔业*, 2003, 33(4): 59-61.]
- [9] Zhu Y F. Effects of ammonia-N with different concentrations and different low pH values on immune functions of *Procambarus clarkii*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2006. [朱毅菲. 不同浓度氨氮、不同低 pH 突变对克氏原螯虾免疫功能的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.]
- [10] Guo C Y, Guan Y Q, Liu B L. Effect of temperature, pH and salinity on gill $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase activity in *Procambarus clarkii*[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2007, 42(6): 96-102. [郭春雨, 管越强, 刘波兰. 温度、pH 和盐度对克氏原螯虾鳃 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase 活性的影响[J]. *动物学杂志*, 2007, 42(6): 96-102.]
- [11] Luo J B, Cao Z H, Cai T R, et al. Acute toxic research of ammonia nitrogen on *Procambarus clarkii* juvenile[J]. *Journal of Yangtze University: Natural Science Edition*, 2006, 3(4): 183-185. [罗静波, 曹志华, 蔡太锐, 等. 氨氮对克氏原螯虾幼虾的急性毒性研究[J]. *长江大学学报: 自然科学版*, 2006, 3(4): 183-185.]
- [12] Deng X H. Function of water pH in aquaculture and its regulatory pathway[J]. *Hebei Fisheries*, 2008(2): 4-6. [邓希海. 养殖水体中 pH 值的作用及调节[J]. *河北渔业*, 2008(2): 4-6.]
- [13] Furtado P S, Fugimura M M S, Monserrat J M, et al. Acute effects of extreme pH and its influences on the survival and biochemical biomarkers of juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. *Mar Freshw Behav Physiol*, 2015, 48(6): 417-429.
- [14] Yu T J, Li J, Li J T, et al. The effects of pH changes on anti-

- oxidant enzyme activities of ridgetail white prawn (*Palaeomon carinicauda*)[J]. Marine Sciences, 2015, 39(5): 47–53. [于天基, 李健, 李吉涛, 等. pH 胁迫对脊尾白虾抗氧化酶活力的影响[J]. 海洋科学, 2015, 39(5): 47–53.]
- [15] Morgan D O, McMahon B R. Acid tolerance and effects of sublethal acid exposure on iono-regulation and acid-base status in two crayfish *Procambarus clarki* and *Orconectes rusticus*[J]. J Exp Biol, 1982, 97(1): 241–252.
- [16] Han X L, Xie Y, Li X R, et al. The effect of the temperature on physiological index of the *Procambarus clarkii*[J]. Journal of Aquaculture, 2013, 34(1): 37–40. [韩晓磊, 谢雨, 李小蕊, 等. 温度对克氏原螯虾生理特征的影响[J]. 水产养殖, 2013, 34(1): 37–40.]
- [17] Satyavathi C, Rao Y P. Inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase in *Penaeus indicus* postlarvae by lead[J]. Comp Biochem Physiol C: Pharmacol, Toxicol Endocrinol, 2000, 127(1): 11–22.
- [18] Pan L Q, Liu Z, Jiang L X. The effect of salinity and pH changes on gill Na^+ - K^+ -ATPase activity of *Litopenaeus vannamei*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2004, 34(5): 787–790. [潘鲁青, 刘志, 姜令绪. 盐度、pH 变化对凡纳滨对虾鳃丝 Na^+ - K^+ -ATPase 活力的影响[J]. 中国海洋大学学报, 2004, 34(5): 787–790.]
- [19] Zhao X Y, Li J, Chen P, et al. Effects of pH stress on survival rate and activities of ion-transport enzyme, immune-related enzymes in three species of shrimps[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2011, 20(5): 720–728. [赵先银, 李健, 陈萍, 等. pH 胁迫对 3 种对虾存活率、离子转运酶和免疫酶活力的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2011, 20(5): 720–728.]
- [20] Lin X T, Zhang Q M, Xu Z N, et al. Advancement of the study on respiratory metabolism of decapod crustaceans[J]. Journal of Fisheries of China, 2000, 24(6): 575–580. [林小涛, 张秋明, 许忠能, 等. 虾蟹类呼吸代谢研究进展[J]. 水产学报, 2000, 24(6): 575–580.]
- [21] Savant K B, Amte G K. Influence of some environmental-factors on respiratory responses in the tropical estuarine crab *Ilyoplax gangetica* (kemp)[J]. J Environ Biol, 1995, 16(4): 311–317.
- [22] Simon L M, Robin E D. Relationship of cytochrome oxidase activity to vertebrate total and organ oxygen consumption[J]. Int J Biochem, 1971, 2(11): 569–573.
- [23] Viru M. Differences in effects of various training regimens on metabolism of skeletal muscles[J]. J Sports Med Phys Fit, 1994, 34(3): 217–227.
- [24] Wang X, Wang F, Lu Y L, et al. Effects of light intensity on the respiratory metabolism of swimming crab (*Portunus trituberculatus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(2): 237–243. [王馨, 王芳, 路允良, 等. 光照强度对三疣梭子蟹呼吸代谢的影响[J]. 水产学报, 2014, 38(2): 237–243.]
- [25] Franco R, Sánchez-Olea R, Reyes-Reyes E M, et al. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois[J]. Mutat Res/Genet Toxicol Environ Mutagen, 2009, 674(1–2): 3–22.
- [26] Parihar M S, Javeri T, Hemnani T, et al. Responses of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reduced glutathione antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature[J]. J Therm Biol, 1997, 22(2): 151–156.
- [27] 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. [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.]
- [28] Fang Y Z, Zheng R L. Theory and Application of Free Radical Biology[M]. Beijing: Science Press, 2008: 1–24. [方允中, 郑荣梁. 自由基生物学的理论与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 1–24.]
- [29] Han X L, Gao B Q, Wang H F, et al. Effects of low salinity stress on microstructure of gill and hepatopancreas and family survival rate of *Portunus trituberculatus*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2014, 35(1): 104–110. [韩晓琳, 高保全, 王好锋, 等. 低盐胁迫对三疣梭子蟹鳃和肝胰腺显微结构及家系存活的影响[J]. 渔业科学进展, 2014, 35(1): 104–110.]
- [30] Wang Q, Wang J G, Lu H D, et al. Chronic toxicity of zinc sulphate in *Procambarus clarkii*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(1): 126–137. [王权, 王建国, 陆宏达, 等. 硫酸锌慢性毒性胁迫下克氏原螯虾的组织病理[J]. 中国水产科学, 2012, 19(1): 126–137.]
- [31] Caceci T, Neck K F, Lewis D D H, et al. Ultrastructure of the hepatopancreas of the Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda)[J]. J Mar Biol Assoc UK, 1988, 68(2): 323–337.
- [32] Hong M L, Chen L Q, Gu S Z, et al. Effects of ammonia exposure on immunity indicators of haemolymph and histological structure of hepatopancreas in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(3): 412–418. [洪美玲, 陈立侨, 顾顺樟, 等. 氨氮胁迫对中华绒螯蟹免疫指标及肝胰腺组织结构的影响[J]. 中国水产科学, 2007, 14(3): 412–418.]
- [33] Zhao L L. Effect of histamine on the digestive function,

- immune and ovarian development of *Neomysis japonica* and *Eriocheir sinensis*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012. [赵柳兰. 组织胺对新糠虾和中华绒螯蟹的消化功能、免疫力以及卵巢发育的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.]
- [34] Yu H N. Effects of environmental stress on behavior, growth and physiological activity of *Macrobrachium rosenbergii* and *Litopenaeus vannamei*[D]. Guangzhou: Jinan University, 2007. [于赫男. 环境胁迫对罗氏沼虾和凡纳滨对虾行为、生长及生理活动的影响[D]. 广州: 暨南大学, 2007.]
- [35] Zhao W H, Wang Z S, Zhang Y X, et al. Effects of estradiol on fatty acid composition and tissue structure of hepatopancreas in *Macrobrachium nipponense*[J]. Marine Fisheries, 2014, 36(6): 542–548. [赵卫红, 王资生, 张余霞, 等. 雌二醇对日本沼虾肝胰腺的脂肪酸含量及组织结构的影响[J]. 海洋渔业, 2014, 36(6): 542–548.]

Acute toxicity of low-pH stress and its effect on enzyme activity and histological structure of gill and hepatopancreas in *Procambarus clarkii*

TAO Yifan^{1,2}, QIANG Jun², WANG Hui³, XU Pao^{1,2}, MA Xinyu¹, ZHAO Wenqiang¹

1. Wuxi Fishery College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture; Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

3. School of Life Science, Huaiyin Normal University, Huai'an 223300, China

Abstract: This study examined the effect of low-pH stress on physiological metabolism and the histological structure of gill and hepatopancreas in *Procambarus clarkii* with the body weight of (25.88±4.40) g, using paraffin section technology and the measurement of biological enzyme activity. Based on the 96 h median lethal concentration (LC₅₀), *P. clarkii* were exposed to pH LC₅₀ water for 96 h. A control group of the species was also exposed to water of pH 7.6. Each pH level was sampled to measure the activity of metabolic enzymes in the gill and antioxidant properties in the hepatopancreas, and the histological structure of gill and hepatopancreas was observed at 0 h, 2 h, 8 h, 24 h and 96 h. The results showed that the value of pH LC₅₀ was 3.675 at 96 h. The activity of Na⁺-K⁺-ATPase and lactate dehydrogenase (LDH) in gills of the experimental group gradually increased, while activity of cytochrome oxidase (COO) in the gill showed the opposite trend after low-pH stress. As pH stress time was prolonged, the activity of hepatopancreas superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in the experimental group increased at first, then declined. The MDA content in the experimental group increased consistently during the exposure time ($P < 0.05$). Observation of gill microstructure sampled from *P. clarkii* exposed to low-pH water (pH 3.6) showed impairment of cuticle and exfoliation of respiratory epithelium cells. Observation of hepatopancreas microstructure sampled from *P. clarkii* exposed to low-pH water (pH 3.6) indicated the appearance of more B cells and inter-transferred vacuoles in the hepatopancreas tubules, which were enlarged. I am not sure I have understood your intention correctly, so please check carefully. It also showed that the number of granular materials in the transferred vacuoles had increased and that the structure of the hepatopancreas tubules was impaired. The study indicated that low-pH stress will affect the physiological metabolism and lead to hypoxia. Antioxidant activities by *P. clarkii* will be induced by short-term pH stress but inhibited when exposure time is prolonged. Low-pH stress will damage the structure of both gill and hepatopancreas.

Key words: *Procambarus clarkii*; pH; median lethal concentration; enzymes activity; tissue slice; acute stress

Corresponding author: XU Pao. E-mail: xup@ffrc.cn