

pH 胁迫对菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*) 耗氧率、排氨率、免疫和抗氧化酶活性以及组织 形态的影响*

陈 强^{1,2} 林 毅^{1,2} 黎中宝^{1,2} 黄张帆^{1,2} 孔鲁闽^{1,2} 周思顺^{1,2} 龙中英^{1,2}

(1. 集美大学水产学院 福建厦门 361021; 2. 福建省海洋渔业资源与生态环境重点实验室 福建厦门 361021)

摘要 随着人类工业迅速发展, CO₂ 大量排放, 引起了海洋的酸化效应, 不仅导致了全球气候变暖, 也严重危害了海洋生物的生态健康。以菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)为研究对象, 研究 pH 变化对菲律宾蛤仔耗氧率、排氨率、鳃组织结构以及鳃和内脏团的免疫、抗氧化酶活性的影响。将菲律宾蛤仔置于酸化海水(pH 6.4、7.1 和 7.7)中, 以自然海水(pH 8.1)为对照。结果表明: 耗氧率和排氨率随着 pH 的升高或降低而降低, 在 pH=8 时达到最大值; 6.4 酸化组蛤仔鳃组织结构损伤严重, 鳃丝间距扩大, 纤毛黏合; 鳃组织碱性磷酸酶(AKP)第 42 天所有酸化组活性显著高于对照组($P<0.05$), 所有酸化组溶菌酶(LZM)和酸性磷酸酶(ACP)活性显著低于对照组($P<0.05$), 7.7 酸化组超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性和总抗氧化能力(T-AOC)显著高于对照组($P<0.05$), 所有酸化组丙二醛(MDA)含量显著低于对照组($P<0.05$); 内脏团 7.1 和 7.7 酸化组 LZM 活性显著高于对照组($P<0.05$), 所有酸化组 T-AOC 和 SOD 活性显著高于对照组($P<0.05$), 7.1 和 7.7 酸化组 MDA 含量显著低于对照组($P<0.05$)。酸化致使菲律宾蛤仔耗氧率和排氨率降低, 减缓其生理活动, 降低鳃组织的免疫和抗氧化酶活性, 打破蛤仔原有的代谢水平, 会增加蛤仔患病的可能性。

关键词 pH; 菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*); 耗氧率; 排氨率; 免疫; 抗氧化

中图分类号 Q955; S968.3 **doi:** 10.11693/hyhz20230100013

自工业革命后, CO₂ 急剧增长的排放量已经大幅度超过了海洋碳循环的自我平衡调节能力(Sabine *et al*, 2004), 空气中近 50%的 CO₂ 被海洋吸收, 严重破坏了海洋中的碳酸盐体系, 造成海洋酸化(Doney *et al*, 2009)。政府间气候变化专门委员会(Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC)预测在 20 世纪末海水 pH 由原本的 8.1 下降到 7.8, 如果未控制 CO₂ 排放量, 到 2300 年 pH 可能持续下降 0.8~0.9, 到 2500 年 pH 可能会下降到 6.4~6.5 (Caldeira *et al*, 2003), 将严重影响海洋生态系统的平衡。为了控制 CO₂ 的增加, 国际上正在开展 CO₂ 封存技术(Carbon Capture and Storage, CCS) (Reguera *et al*, 2009), 而因为技术的发

展不同, 在运输或封存过程中会导致 CO₂ 的泄漏, 这将会使周围海域的 pH 降低。有模拟实验表明 CO₂ 的泄漏会使海水 pH 急剧降低到 5.6 左右, 恢复过程中会在 pH 6.4 保持很长一段时间(Widdicombe *et al*, 2007)。近几年已经有较多海洋生物受到海洋酸化的影响: 如海水 pH 的降低使生物的耗氧率、排氨率降低(杨杰青等, 2016; 陆莉莉等, 2022), 海水酸化能通过干扰双壳动物的能量代谢途径来影响免疫功能(Bibby *et al*, 2008; Lannig *et al*, 2010), 海水酸化还是一种促氧化的胁迫源, 会影响海洋生物机体的氧化作用(Ricevuto *et al*, 2016; Nardi *et al*, 2017; Munari *et al*, 2018)。海水酸化已经严重影响到海洋生物的生活

* 福建省自然科学基金项目, 2020J01668 号。陈 强, 博士, E-mail: ahcq@jmu.edu.cn

收稿日期: 2023-01-18, 收修改稿日期: 2023-04-25

和生存环境,也影响到了海洋经济发展。

贝类作为海洋碳循环的重要参与者,对海洋环境的变化具有较强的适应性,目前贝类是研究海洋和海岸生态系统的重要“模式生物”(Ji *et al.*, 2006)(高山等, 2017; 王婷等, 2022),能够作为海洋指示生物来反映海洋酸化的影响。菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)亦称马尼拉蛤仔、花蛤,常栖息于潮间带或潮下带泥沙底部(庄启谦, 2001),为我国四大养殖贝类之一,是重要的经济物种之一。目前关于酸化对菲律宾蛤仔生理生化影响的研究较少,本研究选择菲律宾蛤仔作为受试生物,通过使用 HCl 调节海水 pH (pH 6.4、7.1 和 7.7)探究菲律宾蛤仔生理生化的变化情况,明确菲律宾蛤仔对海洋酸化的反应,期望为菲律宾蛤仔的养殖管理提供可靠的数据,为未来研究海洋酸化对海洋生物的影响提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)购自厦门市高崎水产批发市场,取活泼无损伤个体,体型规格为:壳长(3.3±0.2) cm,壳宽(2.1±0.1) cm,壳高(1.8±0.2) cm,体重(8.5±0.5) g。试验开始前蛤仔均在水箱中暂养 1 周,暂养期间保持连续充气,每日投喂足量小球藻(*Chlorella sp.*),投喂 1 h 后 100% 换水 1 次,暂养温度(25±1) °C,盐度 31±2, pH 8.0±0.1 (正常海水 pH)。试验期间所用海水均为海水晶配置海水,海水晶均购买自浙江蓝海海盐制品有限公司,是以天然海盐经过添加少量 Mg、K、Ca、Zn、Se、Mo 等微量元素研制而成。

1.2 试验设计

1.2.1 生理试验设计 试验采用静水密封的方法,设置 pH 为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 共 5 个梯度,每个梯度设 3 个重复,1 个空白对照,以 pH 8.0 组为对照组;通过滴加 NaOH 和 HCl 调节海水 pH,稳定后挑选 90 个健康、规格一致的蛤仔,随机放置到 1.1 L 的 PE 广口塑料瓶中,待蛤仔伸出水管 6 h 后测量水体溶解氧和氨氮浓度。

1.2.2 生化试验设计 本试验设置 4 个 pH 梯度,对照组(pH 8.0±0.1), 6.4 组(pH 6.4±0.1), 7.1 组(pH 7.1±0.1), 7.7 组(pH 7.7±0.1), 每组 3 个重复;酸化组通过滴加 1 mol/L HCl 降低水体 pH。菲律宾蛤仔暂养

驯化一周后挑选 600 个健康无损害,规格一致个体,随机放置到 12 个水缸中,每缸蛤仔数量为 50,实验共进行 42 d,每天投喂足量小球藻,投喂 1 h 后吸污换水 1/3,试验在第 14、28 和 42 天采样。

1.2.3 采样与样品制备 用已灭菌剪刀和镊子在冰盒中快速取每个菲律宾蛤仔的内脏团和鳃组织,用预冷的生理盐水(0.9%)冲洗,滤纸吸干水分,每组重复分别取 6 个菲律宾蛤仔组织,每个组织用分析天平称重 0.2~1.0 g 分装到 2 个离心管中,每个离心管中含有 3 个蛤仔的相同组织(进行混样),加入 9 倍体积的 0.9% 生理盐水,用组织研磨器低温下研磨。低温高速离心机 4 °C 下 3 000 r/min,离心 10 min 取上清液测酶活性。此外,每组重复取 3 个蛤仔的鳃组织放置于 4% 多聚甲醛溶液中固定,用于组织形态观察分析。

1.3 计算方法

$$OR = [(DO_0 - DO_t) \cdot V] / (W \cdot t), \quad (1)$$

式中,OR 为单位菲律宾蛤仔干重耗氧率[单位: mg/(g·h)], DO₀、DO_t 分别为实验开始和实验结束时实验水体中溶解氧含量(单位: mg/L), V 为实验 PE 广口塑料瓶中所用水的体积(单位: L), W 为实验蛤仔软组织干重(单位: g), t 为实验持续的时间(单位: h)。

$$NR = [(N_t - N_0) \cdot V] / (W \cdot t), \quad (2)$$

式中,NR 为单位蛤仔干重排氮率[单位: mg/(g·h)], N_t、N₀ 为实验结束时和实验开始水中氨氮的浓度(单位: mg/L), V 为实验 PE 广口塑料瓶中所用水体积(单位: L), W 为实验蛤仔软组织干重(单位: g), t 为实验持续的时间(单位: h)。

1.4 指标测定

酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(AKP)活性使用南京建成试剂盒(微量酶标法)检测,利用酚在碱性溶液中与 4-氨基安替吡啉作用经铁氰化钾氧化生成红色醌衍生物的原理,在酶标仪 520 nm 测定吸光度后可计算酶活性。

溶菌酶(LZM)活性使用南京建成试剂盒(比浊法)检测,因为溶菌酶能水解细菌细胞壁上肽聚糖使细菌裂解而浓度降低,透光度增强,使用分光光度计透光度值计算溶菌酶活性。

总抗氧化能力(T-AOC)通过南京建成试剂盒(ABTS 法)检测,利用 ABTS 会被氧化剂氧化成显色的 ABTS⁺,使用酶标仪测出 ABTS⁺吸光度即可计算样品抗氧化能力。

过氧化氢酶(CAT)活性通过南京建成试剂盒(钼酸铵法)检测。利用钼酸铵与 H_2O_2 产生黄色络合物,使用分光光度计测出的吸光度值计算出过氧化氢酶活性。

超氧化物歧化酶(SOD)活性通过南京建成试剂盒(WST-1 法)检测,丙二醛(MDA)含量通过南京建成试剂盒(TBA 法)检测。

1.5 切片制作

将取好的组织样品迅速裁成规定大小后放入多聚甲苯中,固定 24 h;用水和 70%的乙醇将固定液洗去,水洗后将上述组织依次浸入 75%乙醇/1 h, 95%乙醇/30 min, 100%乙醇/30 min, 进行脱水;脱水后将组织浸蜡和包埋,室温冷却后进行切片后使用苏木精伊红染色。

1.6 数据分析

试验数据于 EXCEL 中进行初步处理统计,之后使用 SPSS 19.0 软件进行方差分析。运用 Duncan test 对数据进行显著性检验,显著性水平为 0.05。试验数据以平均值 \pm 标准误表示。

2 结果

2.1 pH 对菲律宾蛤仔生理指标的影响

2.1.1 pH 对菲律宾蛤仔耗氧率的影响 pH 对菲律宾蛤仔耗氧率的影响见图 1。由图 1 可知, pH 5.0~8.0 时耗氧率呈上升趋势, pH 8.0~9.0 时耗氧率呈下降趋势,在 pH 8.0 时达到顶峰为 0.34 mg/(g·h),显著高于 pH 5.0、6.0、7.0、9.0 ($P<0.05$)。

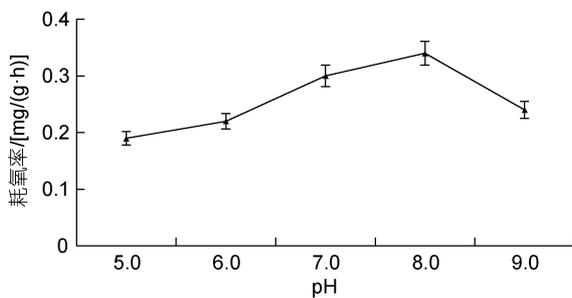


图 1 pH 对菲律宾蛤仔耗氧率的影响

Fig.1 Effect of pH on oxygen consumption rate of *R. philippinarum*

2.1.2 pH 对菲律宾蛤仔排氨率的影响 pH 对菲律宾蛤仔排氨率的影响见图 2。由图 2 可知, pH 5.0~8.0 时耗氧率呈上升趋势, pH 8.0~9.0 时耗氧率呈下降趋势,当 pH 为 8.0 时,排氨率达到峰值为 0.071 mg/(g·h),显著高于 pH 5.0、6.0、7.0、9.0 ($P<0.05$)。

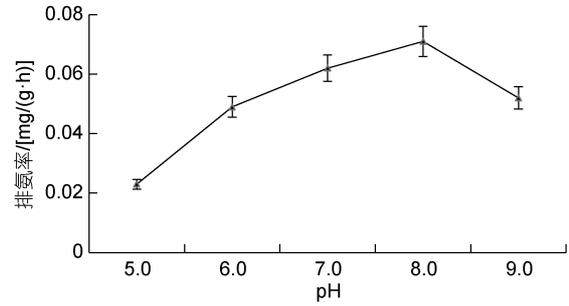


图 2 pH 对菲律宾蛤仔排氨率的影响

Fig.2 Effect of pH on ammonia excretion rate of *R. philippinarum*

2.2 pH 对菲律宾蛤仔鳃组织结构的影响

经过石蜡切片以及 H.E 染色,观察经过 42 d pH 胁迫菲律宾蛤仔的鳃组织的主要结构发现:对照组的鳃丝较为正常(图 3a, 箭头所示); 7.7 组的鳃丝间距扩大,鳃丝间的空腔变大(图 3b, 箭头所示); 7.1 组相对对照组鳃丝间距扩大(图 3c, 箭头所示); 6.4 组的鳃丝不规则变形,间距更大,鳃上皮细胞损伤,鳃丝纤毛排列紊乱黏合(图 3d, 箭头所示)。

2.3 pH 对菲律宾蛤仔生化指标的影响

2.3.1 pH 对菲律宾蛤仔鳃免疫酶活性的影响 由图 4 可得,鳃组织中的溶菌酶(LZM)活性趋势为先升后降,第 14 天酸化组显著低于对照组($P<0.05$), 6.4 组显著低于其他酸化组($P<0.05$), 7.1 组显著低于 7.7 组($P<0.05$); 第 28、42 天 6.4 组显著低于其他组($P<0.05$), 7.1 与 7.7 组间无差异性,皆显著低于对照组($P<0.05$)。

酸性磷酸酶(ACP)活性趋势各组不相同;第 14 天 6.4 组显著高于其他组($P<0.05$), 7.1 组显著低于 7.7 组和对照组($P<0.05$), 7.7 组显著低于对照组($P<0.05$); 第 28 天 6.4 与 7.1 组无差异性,皆显著低于 7.7 和对照组($P<0.05$), 7.7 组显著低于对照组($P<0.05$); 第 42 天 6.4 组显著低于其他组($P<0.05$), 7.1 与 7.7 组无差异性,皆显著低于对照组($P<0.05$)。

碱性磷酸酶(AKP)活性趋势各组不相同;第 14 天 6.4 组显著高于其他酸化组($P<0.05$),与对照组无差异性, 7.1 与 7.7 组无差异性,皆显著低于对照组($P<0.05$); 第 28 天 6.4、7.1 和对照组无差异性,皆显著低于 7.7 组($P<0.05$); 第 42 天 6.4 组显著高于 7.1 和对照组($P<0.05$),显著低于 7.7 组($P<0.05$), 7.1 组显著高于对照组且显著低于 7.7 组($P<0.05$), 7.7 组显著高于对照组($P<0.05$)。

2.3.2 pH 对菲律宾蛤仔内脏团免疫酶活性的影响

由图 5 可得,内脏团 LZM 活性变化趋势为先升后降;第 14 天 6.4 组显著高于 7.1 组($P<0.05$),显著低于 7.7

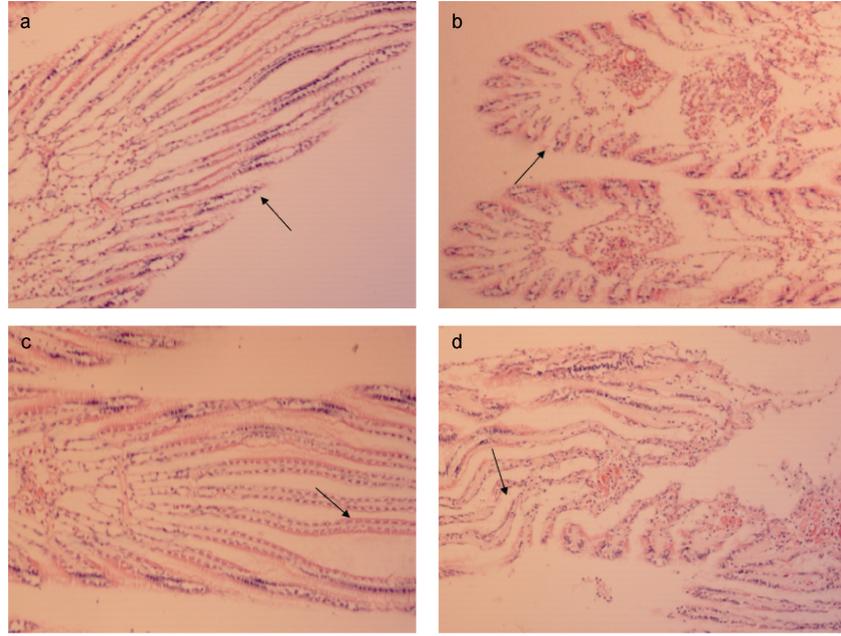


图 3 pH 对菲律宾蛤仔鳃组织结构的影响
Fig.3 Effects of pH on the tissue structure of *R. philippinarum*
注: a. 对照组; b. 7.7 酸化组; c. 7.1 酸化组; d. 6.4 酸化组

和对照组($P < 0.05$), 7.1 组显著低于 7.7 和对照组($P < 0.05$), 7.7 组显著低于对照组($P < 0.05$); 第 28 天 6.4 组显著高于 7.1 和对照组($P < 0.05$), 显著低于 7.7 组($P < 0.05$), 7.1 组显著低于 7.7 组($P < 0.05$), 显著高于对照组($P < 0.05$), 7.7 组显著高于对照组($P < 0.05$); 第 42 天 6.4 组显著低于其他酸化组($P < 0.05$), 与对照组无差异性, 7.1 与 7.7 组无差异性。

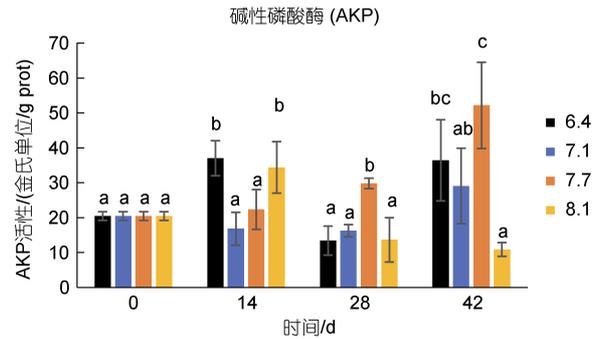
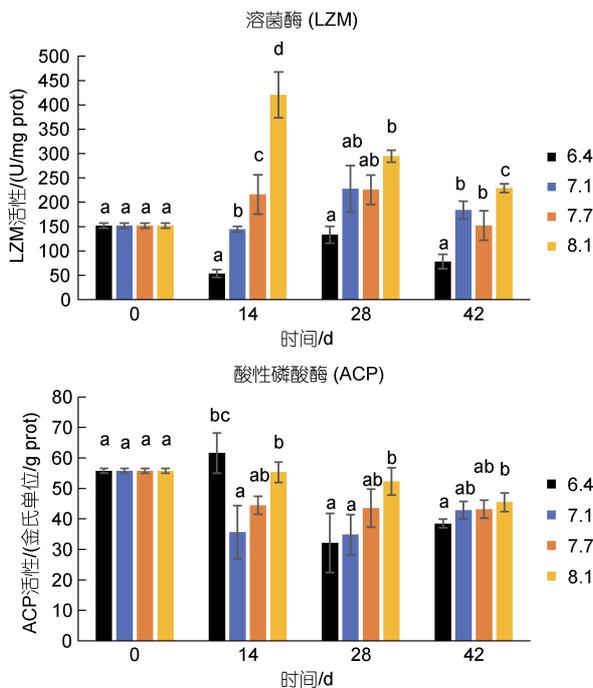


图 4 pH 对菲律宾蛤仔鳃组织免疫酶活性的影响
Fig.4 Effect of pH on immunoenzyme activity in gill of *R. philippinarum*
注: 标有不同小写字母表示组间有显著性差异($P < 0.05$)。图 5、图 6、图 7 同

ACP 活性变化趋势为先升后降; 第 14 天 6.4 与 7.1 组无差异性, 显著高于 7.7 组和对照组($P < 0.05$), 7.7 与对照组无差异性; 第 28 天 6.4 组显著高于其他组($P < 0.05$), 7.1 与 7.7 组无差异性, 皆显著高于对照组($P < 0.05$); 第 42 天各组间无差异性。

AKP 活性变化趋势为持续下降; 第 14、28 天 6.4 组与 7.1 组无差异性, 显著低于 7.7 组($P < 0.05$), 显著高于对照组($P < 0.05$), 7.7 组显著高于对照组($P < 0.05$); 第 42 天各组间无差异性。

2.3.3 pH 对菲律宾蛤仔鳃抗氧化酶活性的影响
由图 6 可得, 超氧化物歧化酶(SOD)活性变化趋势

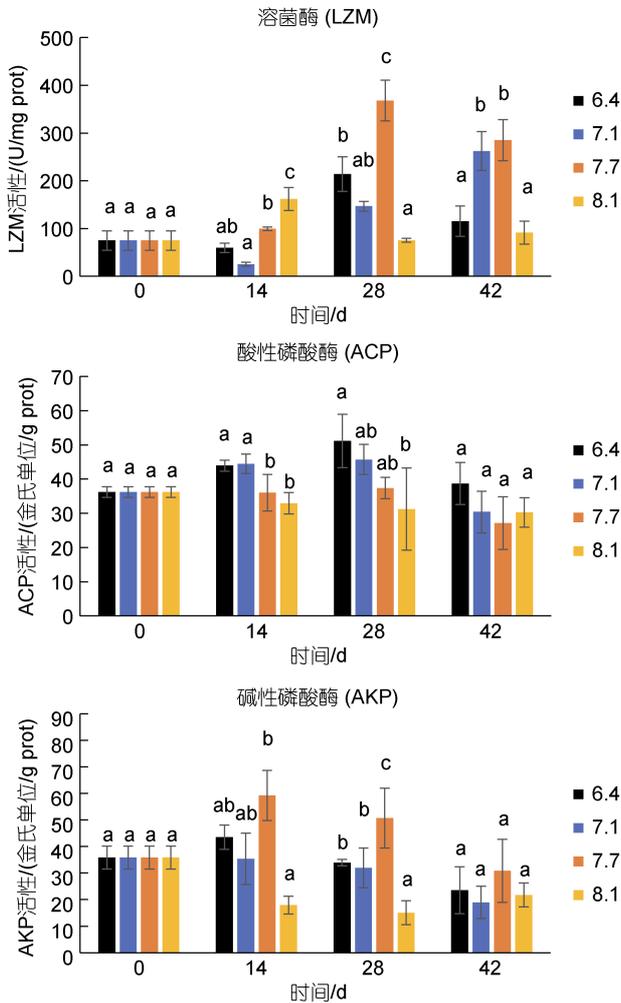


图 5 pH 对菲律宾蛤仔内脏团免疫酶活性的影响

Fig.5 Effect of pH on immune enzyme activity in visceral mass of *R. philippinarum*

持续上升; 第 14 天 6.4 组与 7.7 组无差异性, 显著高于 7.1 组 ($P < 0.05$), 显著低于对照组 ($P < 0.05$), 7.1 组显著低于对照组 ($P < 0.05$); 第 28 天 6.4 组显著低于其他组 ($P < 0.05$), 7.1 组与对照组无差异性, 显著低于 7.7 组 ($P < 0.05$); 第 42 天 6.4 组和 7.1 组与对照组无差异

性, 皆显著低于 7.7 组 ($P < 0.05$).

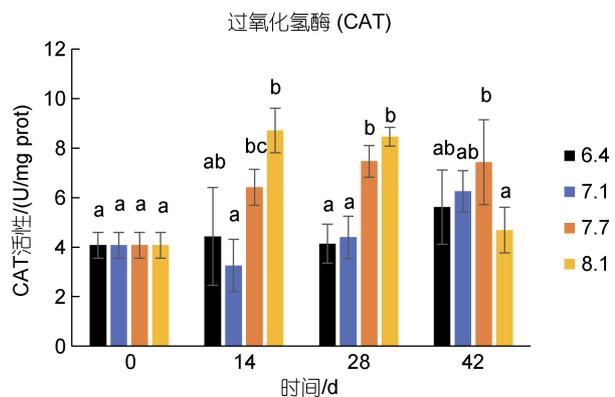
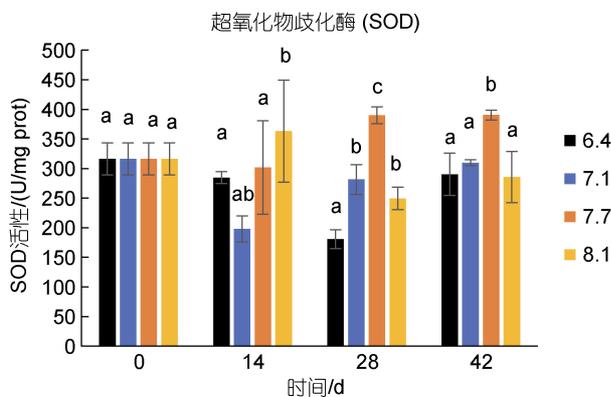
过氧化氢酶(CAT)活性变化趋势各组不相同; 第 14 天 6.4 组显著高于 7.1 组 ($P < 0.05$), 显著低于 7.7 和对照组 ($P < 0.05$), 7.1 组显著低于其他组 ($P < 0.05$), 7.7 组显著高于其他酸化组 ($P < 0.05$), 显著低于对照组 ($P < 0.05$); 第 28 天 6.4 与 7.1 组无差异性, 皆显著低于 7.7 和对照组 ($P < 0.05$), 7.7 与对照组间无差异性; 第 42 天 6.4 与 7.1 组无差异性, 皆显著低于 7.7 组 ($P < 0.05$), 显著高于对照组 ($P < 0.05$), 7.7 组显著高于对照组 ($P < 0.05$).

总抗氧化能力(T-AOC)变化趋势各组不相同; 第 14 天 6.4 组显著低于其他组 ($P < 0.05$), 7.1 组显著高于对照组 ($P < 0.05$), 显著低于 7.7 组 ($P < 0.05$), 7.7 组显著高于对照组 ($P < 0.05$); 第 28 天 6.4 组显著低于其他组 ($P < 0.05$), 7.1 与对照组无差异性, 皆显著低于 7.7 组 ($P < 0.05$); 第 42 天 6.4 与 7.1 组无差异性, 皆显著低于 7.7 组 ($P < 0.05$), 显著高于对照组 ($P < 0.05$), 7.7 组显著高于对照组 ($P < 0.05$).

丙二醛(MDA)含量变化趋势各组不相同; 第 14 天各组间无差异性; 第 28 天 6.4 组显著高于 7.1 组 ($P < 0.05$), 显著低于 7.7 和对照组 ($P < 0.05$), 7.1 组显著低于其他组 ($P < 0.05$), 7.7 与对照组无差异性; 第 42 天酸化组间无差异性, 皆显著低于对照组 ($P < 0.05$).

谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性变化趋势为持续上升; 第 14 天 6.4 组显著高于 7.1 组 ($P < 0.05$), 显著低于 7.7 和对照组 ($P < 0.05$), 7.1 组显著低于其他组 ($P < 0.05$), 7.7 组与对照组无差异性; 第 28、42 天 6.4 组显著低于其他组 ($P < 0.05$), 7.1 组与对照组无差异性, 皆显著低于 7.7 组 ($P < 0.05$).

2.3.4 pH 对菲律宾蛤仔内脏团抗氧化酶活性的影响 由图 7 可得, 内脏团组织 SOD 活性变化趋势为持续下降; 第 14、42 天 6.4 组显著高于其他组 ($P < 0.05$), 7.1 与 7.7 组无差异性, 皆显著高于对照组



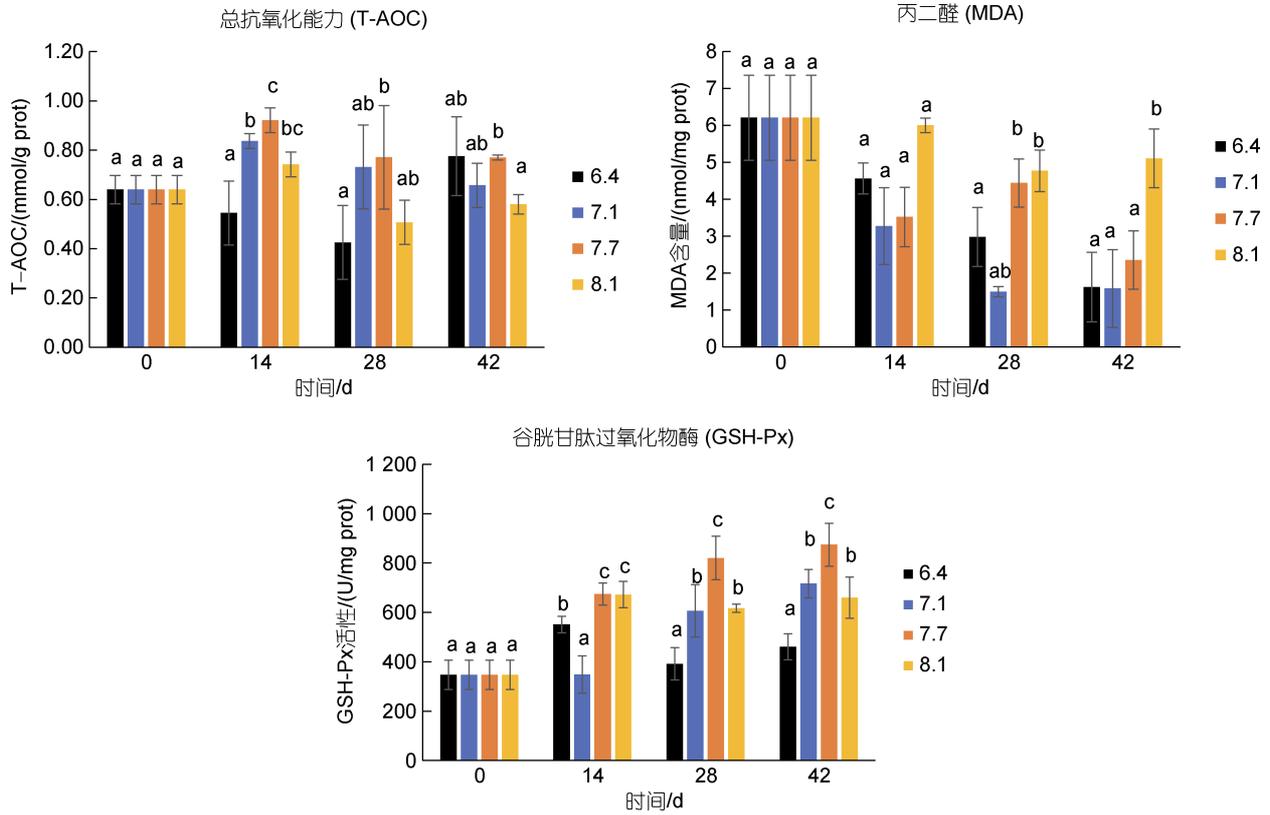


图 6 pH 对菲律宾蛤仔鳃组织抗氧化酶活性的影响
Fig.6 Effect of pH on antioxidant enzyme activity in gill of *R. philippinarum*

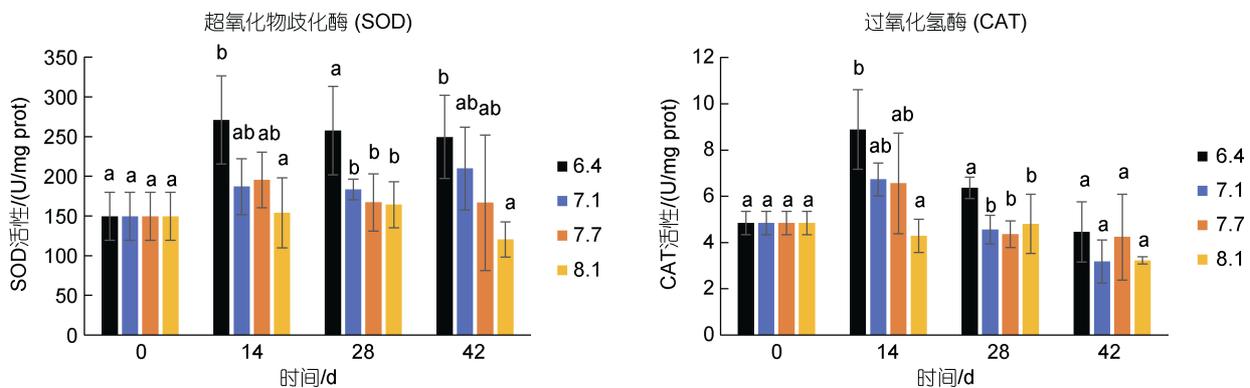
($P < 0.05$); 第 28 天 6.4 组显著高于其他组($P < 0.05$), 7.1、7.7 组和对照组无差异性。

CAT 活性变化趋势呈下降趋势; 第 14 天 6.4 组显著高于其他组($P < 0.05$), 7.1 与 7.7 组无差异性, 皆显著高于对照组($P < 0.05$); 第 28 天 6.4 组显著高于其他组($P < 0.05$), 7.1、7.7 组和对照组无差异性; 第 42 天各组间无差异性。

T-AOC 变化趋势各组不相同; 第 14 天酸化组间无差异性, 显著高于对照组($P < 0.05$); 第 28 天 6.4 组显著高于其他组($P < 0.05$), 7.1 组显著高于 7.7 与对照

组($P < 0.05$), 7.7 与对照组间无差异性; 第 42 天 6.4 组显著低于其他酸化组($P < 0.05$), 显著高于对照组($P < 0.05$), 7.1 组显著高于 7.7 组($P < 0.05$), 7.7 组显著高于对照组($P < 0.05$)。

MDA 含量变化趋势为持续下降; 第 14 天 6.4 组显著低于 7.1 组($P < 0.05$), 显著高于 7.7 和对照组($P < 0.05$), 7.7 与对照组无差异性; 第 28 天酸化组间无差异性, 皆显著高于对照组($P < 0.05$); 第 42 天 6.4 组显著高于其他酸化组($P < 0.05$), 与对照组无差异性, 7.1 组与 7.7 组无差异性, 皆显著低于对照组($P < 0.05$)。



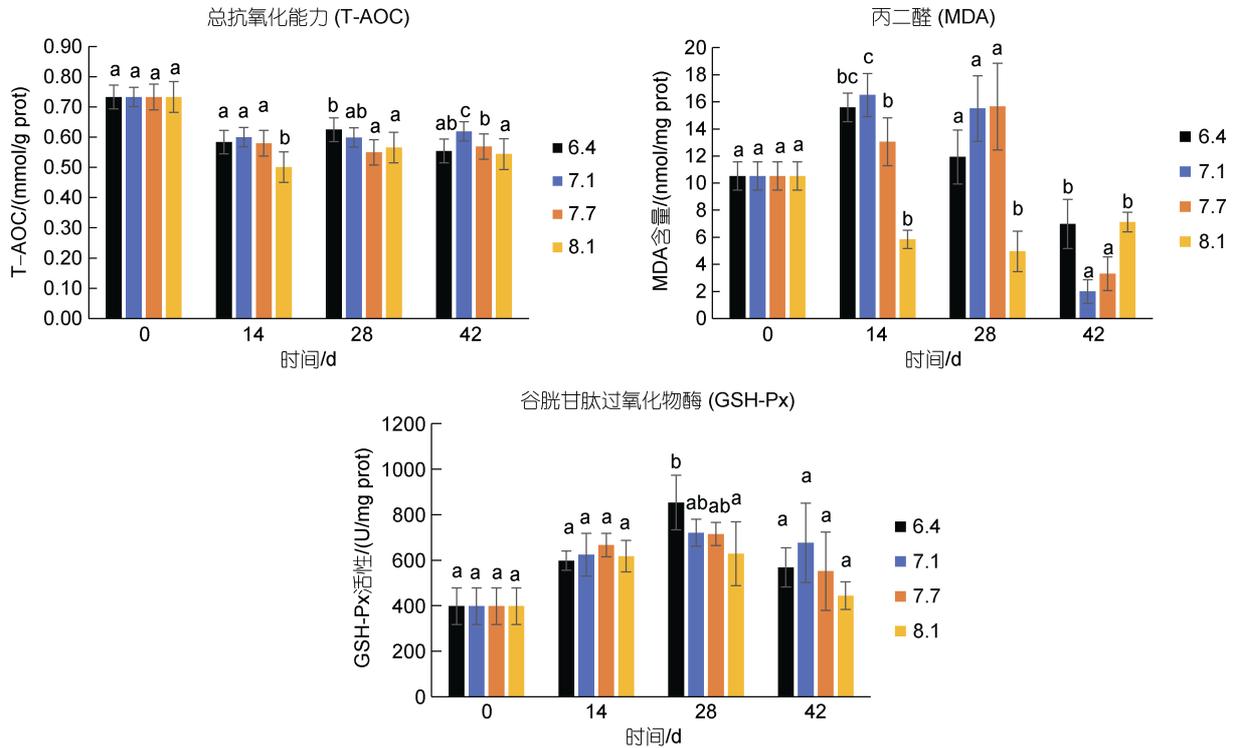


图 7 pH 对菲律宾蛤仔内脏团抗氧化酶活性的影响

Fig. 7 Effect of pH on antioxidant enzyme activity in visceral mass of *R. philippinarum*

GSH-Px 活性变化趋势为先升后降; 第 14、42 天各组间无差异性; 第 28 天 6.4 组显著高于其他组 ($P < 0.05$), 7.1 与 7.7 组无差异性, 皆显著高于对照组 ($P < 0.05$).

3 讨论

耗氧率和排氨率是研究贝类基础新陈代谢的重要内容之一, 能够为水产养殖和生态学研究提供基础性的资料, 已知有多种环境因素能够影响新陈代谢的过程。已有多项研究各种因素影响滤食性贝类耗氧率和排氨率的影响(胥贤等, 2015; 刘傲东等, 2016; 王静等, 2019; 卢王梯等, 2020; 江天棋等, 2020), 但是并未发现有关于 pH 对菲律宾蛤仔耗氧率和排氨率影响的研究。pH 的升高或降低都有可能会导致蛤仔组织的损伤从而影响了生理代谢; 黑唇鲍 (*Haliotis rubra*) (Harris *et al.*, 1999)、长肋日月贝 (*Amusium pleuronectes*) (严俊贤等, 2018) 和东方小藤壶 (*Chthamalus challengerii*) (曹善茂等, 2013) 在低 pH 时的耗氧率和排氨率低, 本文中当 pH 低于 8.0 时, 耗氧率和排氨率随之降低, 说明低 pH 不利于贝类的呼吸代谢; 本研究蛤仔的耗氧率和排氨率在 pH 8.0 时达到顶峰, 一般贝类的耗氧率和排氨率在 8.0~8.5 时出现最大值, 如尖紫蛤 (*Soletellina acuta*) (黄洋等, 2013) 在 pH 8.4 时达到最大

值、合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*) (刘建业等, 2011) 的最大值在 pH 8.0 时出现; 当 pH 过高时, 贝类的生理活动也会受到影响, 当 pH 9.0 时耗氧率和排氨率呈显著下降的趋势。说明贝类的生理活动与 pH 的变化息息相关。

免疫防御和抗氧化防御系统是软体动物防御系统的一部分。免疫防御分为细胞免疫和体液免疫 (Loker *et al.*, 2004), 细胞免疫主要依赖血细胞的吞噬作用, 体液免疫主要依靠凝集素、溶血素、溶酶体酶和酚氧化酶等各种非特异性的酶和免疫因子的共同作用(刘志鸿等, 2003)。酸性磷酸酶和碱性磷酸酶是溶酶体的重要的组成部分, 在酸性环境下, ACP 进行水解作用, 把表面带有磷酸酯的异物水解掉, 防止机体受到感染(Cheng, 1978); AKP 调节膜运输, 参与转磷酸作用, 促进体内的钙磷代谢, 维持体内适宜的钙磷比例(Beedham, 1958; 郑艺杰, 2006)。在李晓梅等(2016)的研究中发现近江牡蛎 (*Crassostrea ariakensis*) 鳃组织中的 LZM 活性会随着 pH 的降低而降低; 在梁健等(2017)的研究中发现青蛤 (*Cyclina sinensis*) 的 LZM 活性随着时间呈先升后降的趋势。本研究中内脏团中 ACP 和 AKP 活性相对高于鳃组织, 可以猜测内脏团是机体防御免疫的主要场所; 在 42 d 的胁迫中,

免疫酶活性趋势为先上升后下降,推测可能是由于前期的胁迫导致蛤仔产生应激反应,从而产生大量的酶来抵御环境的变化;第 42 天免疫酶活性下降,说明蛤仔对环境已经趋于适应,但在 42 d 的 pH 胁迫后蛤仔组织已经损伤了,酶活性不能恢复到原有水平。

抗氧化防御系统是应对环境污染胁迫做出快速响应的一类物质总称,主要包括非酶类抗氧化剂和酶类抗氧化剂(蒋国萍, 2016)。在贝类的防御系统中,酶类抗氧化剂起着不断清除活性氧以维持机体活性氧动态平衡的作用。环境因子的胁迫可能会导致机体组织器官受损产生大量的活性氧(谭志军, 2006),导致机体产生过氧反应,严重可能会导致细胞坏死。在 Wang 等(2016)的研究中发现经过 28 d 的酸化胁迫后酸化组鳃组织中的抗氧化酶活性低于对照组;马广智等(2001)的研究中发现在草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)在酸化条件下 SOD 的活性随着酸化时间的延长而降低;通过 Matozzo 等(2013)的研究发现在低 pH 时鸡帘蛤(*Chamelea gallina*)鳃组织中 SOD 和 CAT 的活性高于对照组;但在本研究中第 14 天鳃组织中 SOD 和 CAT 活性均低于对照组。鳃组织的 CAT 和 SOD 的活性均为先降后升,说明在前期酸化组所设 pH 能够抑制这两种酶类的分泌,但是在经过长期的胁迫后组织可能出现了损伤导致这两种酶活性的升高。在内脏团中,这两种酶类的活性为下降趋势,说明 pH 降低抑制内脏团中这两种酶的释放。

谷胱甘肽过氧化物酶作为抗氧化系统中非酶类抗氧化剂的组成部分,能够清除动物机体内过氧化产物,保证细胞膜结构和功能的完整性(Wang *et al.*, 2008; Pacitti *et al.*, 2013),维持机体内的正常氧化还原反应(Hussain *et al.*, 2004)。在彭玲等(2015)的研究中发现,厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)在不同浓度 Cd 的胁迫下 GSH-Px 的活性为先升后降的趋势;在邓思平等(2012)和于庆云等(2013)的研究中也体现了尖紫蛤和菲律宾蛤仔在重金属的胁迫下 GSH-Px 的活性为先升后降的趋势;这都与本文的研究成果相似。说明在机体受到外界的胁迫时主要依靠 GSH-Px 来清除体内的自由基,使机体内环境保持平衡。

4 结论

(1) pH 的变化对菲律宾蛤仔的生理活动有着较大影响,蛤仔的排氨率和耗氧率随着 pH 升高先增后降,均在 pH 8.0 时达到最大值。

(2) 菲律宾蛤仔在经过 42 d 的 pH 胁迫后,其鳃

组织在不同的酸化组中出现了不同程度的组织损伤,在 6.4 酸化组中组织损伤得更加严重。

(3) 在鳃组织中低 pH 对免疫和抗氧化酶活性有较为明显的抑制作用;而且随着胁迫时间的增加,原有的代谢水平被打破,虽然蛤仔经过较长时间的适应后,其酶活性水平有所回升,但仍达不到原有的水平。另外,长时间的酸化胁迫还可能使蛤仔的抗病力降低,使其更容易死亡。

参 考 文 献

- 于庆云,王悠,徐彦,等,2013. 镉和铅对菲律宾蛤仔脂质过氧化及抗氧化酶活性的影响[J]. 生态毒理学报, 8(4): 504-512.
- 马广智,唐玫,徐军,2001. 低 pH 对草鱼鳃和肝组织超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响[J]. 中国水产科学, 8(1): 23-25.
- 王婷,郑佳慧,胡梦红,等,2022. 海洋酸化对贝类的生理生态学影响研究进展[J]. 海洋科学, 46(1): 192-202.
- 王静,姚翠鸾,2019. 温度胁迫对紫贻贝与翡翠贻贝生理活动的影响和 Hsp27 的响应[J]. 集美大学学报(自然科学版), 24(1): 1-9.
- 邓思平,赵云涛,朱春华,等,2012. 镉对尖紫蛤抗氧化酶活性及脂质过氧化的影响[J]. 水生生物学报, 36(4): 689-695.
- 卢王梯,司圆圆,陈兴汉,等,2020. 温度对近江牡蛎稚贝耗氧和排氨的影响[J]. 江西水产科技(6): 9-12.
- 庄启谦,2001. 中国动物志,软体动物门,双壳纲,帘蛤科[M]. 北京: 科学出版社.
- 刘志鸿,牟海津,王清印,2003. 软体动物免疫相关酶研究进展[J]. 海洋水产研究, 24(3): 86-90.
- 刘建业,喻达辉,李金碧,2011. 盐度和 pH 对合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)耗氧率和排氨率的影响[J]. 海洋与湖沼, 42(4): 603-607.
- 刘傲东,李力,侯令,等,2016. 缺氧与饥饿对马氏珠母贝滤水率和耗氧率的影响[J]. 基因组学与应用生物学, 35(3): 595-602.
- 江天祺,张扬,姜亚洲,等,2020. 高温胁迫对厚壳贻贝摄食、代谢和相关酶活性的影响[J]. 生态学杂志, 39(9): 3048-3056.
- 严俊贤,陈明强,吴开畅,等,2018. 盐度和 pH 对长肋日月贝耗氧率和排氨率的影响[J]. 水产科学, 37(2): 181-186.
- 李晓梅,郭体环,张来军,等,2016. 海洋酸化背景下铅胁迫对近江牡蛎溶菌酶活性的影响[J]. 江苏农业科学, 44(12): 297-299.
- 杨杰青,蒋玫,李磊,等,2016. pH、盐度对文蛤呼吸与排泄的影响[J]. 海洋渔业, 38(4): 406-414.
- 陆莉莉,喻达辉,李雷旭,等,2022. 温度、盐度和 pH 对钝缢锦蛤耗氧率和排氨率的影响[J]. 海洋科学, 46(10): 113-121.
- 郑艺杰,2006. 西施舌非特异性免疫研究[D]. 福州: 福建农林大学.
- 胥贤,杨凤,朱恒涛,等,2015. 低温对 3 种壳色菲律宾蛤仔幼贝耗氧率和排氨率的影响[J]. 大连海洋大学学报, 30(6): 627-633.
- 高山,梁健,李永仁,等,2017. 海水酸化对青蛤耗氧率和排氨率的影响[J]. 水产科学, 36(6): 758-762.

- 黄洋, 黄海立, 林国游, 等, 2013. 盐度、pH 和规格对尖紫蛤 (*Soletellina acuta*) 耗氧率和排氨率的影响[J]. 海洋与湖沼, 44(1): 120-125.
- 曹善茂, 李校建, 亢玉静, 等, 2013. pH、盐度对东方小藤壶耗氧率和排氨率的影响[J]. 河北渔业(5): 13-17, 44.
- 梁健, 高山, 李永仁, 等, 2017. 海洋酸化对青蛤免疫指标的影响[J]. 海洋科学, 41(11): 38-44.
- 彭玲, 曾江宁, 黄伟, 等, 2015. 厚壳贻贝抗氧化酶活性和脂质过氧化物含量对 Cd 和 Aroclor 1254 胁迫的响应[J]. 生态学杂志, 34(3): 718-726.
- 蒋国萍, 2016. 海洋酸化条件下重金属 Cd²⁺、Hg²⁺对斧文蛤生态毒理效应研究[D]. 上海: 上海海洋大学.
- 谭志军, 2006. 塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)对鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)的危害机制研究[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所).
- BEEDHAM G E, 1958. Observations on the mantle of the lamellibranchia [J]. Journal of Cell Science, s3-99(46): 181-197.
- BIBBY R, WIDDICOMBE S, PARRY H, et al, 2008. Effects of ocean acidification on the immune response of the blue mussel *Mytilus edulis* [J]. Aquatic Biology, 2(1): 67-74.
- CALDEIRA K, WICKETT M E, 2003. Oceanography: anthropogenic carbon and ocean pH [J]. Nature, 425(6956): 365.
- CHENG T C, 1978. The role of lysosomal hydrolases in molluscan cellular response to immunologic challenge [M] // BULLA L A, CHENG T C. Invertebrate Models for Biomedical Research. New York: Springer: 59-71.
- DONEY S C, TILBROOK B, ROY S, et al, 2009. Surface-ocean CO₂ variability and vulnerability [J]. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, 56(8/9/10): 504-511.
- HARRIS J O, MAGUIRE G B, EDWARDS S J, et al, 1999. Effect of pH on growth rate, oxygen consumption rate, and histopathology of gill and kidney tissue for juvenile greenlip abalone, *Haliotis laevis* Donovan and blacklip abalone, *Haliotis rubra* Leach [J]. Journal of Shellfish Research, 18(2): 611-619.
- HUSSAIN S P, AMSTAD P, HE P J, et al, 2004. p53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis [J]. Cancer Research, 64(7): 2350-2356.
- JI J, CHOI H J, AHN I Y, 2006. Evaluation of Manila clam *Ruditapes philippinarum* as a sentinel species for metal pollution monitoring in estuarine tidal flats of Korea: effects of size, sex, and spawning on baseline accumulation [J]. Marine Pollution Bulletin, 52(4): 447-453.
- LANNIG G, EILERS S, PÖRTNER H O, et al, 2010. Impact of ocean acidification on energy metabolism of oyster, *Crassostrea gigas*—changes in metabolic pathways and thermal response [J]. Marine Drugs, 8(8): 2318-2339.
- LOKER E S, ADEMA C M, ZHANG S M, et al, 2004. Invertebrate immune systems—not homogeneous, not simple, not well understood [J]. Immunological Reviews, 198(1): 10-24.
- MATOZZO V, CHINELLATO A, MUNARI, et al, 2013. Can the combination of decreased pH and increased temperature values induce oxidative stress in the clam *Chamelea gallina* and the mussel *Mytilus galloprovincialis*? [J]. Marine Pollution Bulletin, 72(1): 34-40.
- MUNARI M, MATOZZO V, GAGNÉ F, et al, 2018. Does exposure to reduced pH and diclofenac induce oxidative stress in marine bivalves? A comparative study with the mussel *Mytilus galloprovincialis* and the clam *Ruditapes philippinarum* [J]. Environmental Pollution, 240: 925-937.
- NARDI A, MINCARELLI L F, BENEDETTI M, et al, 2017. Indirect effects of climate changes on cadmium bioavailability and biological effects in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* [J]. Chemosphere, 169: 493-502.
- PACITTI D, WANG T, PAGE M M, et al, 2013. Characterization of cytosolic glutathione peroxidase and phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their modulation by *in vitro* selenium exposure [J]. Aquatic Toxicology, 130/131: 97-111.
- REGUERA D F, RIBA I, FORJA J M, et al, 2009. An integrated approach to determine sediment quality in areas above CO₂ injection and storage in agreement with the requirements of the international conventions on the protection of the marine environment [J]. Ecotoxicology, 18(8): 1123-1129.
- RICEVUTO E, LANZONI I, FATTORINI D, et al, 2016. Arsenic speciation and susceptibility to oxidative stress in the fanworm *Sabella spallanzanii* (Gmelin) (Annelida, Sabellidae) under naturally acidified conditions: an *in situ* transplant experiment in a Mediterranean CO₂ vent system [J]. Science of the Total Environment, 544: 765-773.
- SABINE C L, FEELY R A, GRUBER N, et al, 2004. The oceanic sink for anthropogenic CO₂ [J]. Science, 305(5682): 367-371.
- WANG L, YAN B, LIU N, et al, 2008. Effects of cadmium on glutathione synthesis in hepatopancreas of freshwater crab, *Sinopotamon yangtsekiense* [J]. Chemosphere, 74(1): 51-56.
- WANG Q, CAO R W, NING X X, et al, 2016. Effects of ocean acidification on immune responses of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 49: 24-33.
- WIDDICOMBE S, NEEDHAM H R, 2007. Impact of CO₂-induced seawater acidification on the burrowing activity of *Nereis virens* and sediment nutrient flux [J]. Marine Ecology Progress Series, 341: 111-122.

EFFECTS OF pH STRESS ON OXYGEN CONSUMPTION RATE, AMMONIA EXCRETION RATE, IMMUNE AND ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITY AND TISSUE MORPHOLOGY OF CLAM *RUDITAPES PHILIPPINARUM*

CHEN Qiang^{1,2}, LIN Yi^{1,2}, LI Zhong-Bao^{1,2}, HUANG Zhang-Fan^{1,2}, KONG Lu-Min^{1,2},
ZHOU Si-Shun^{1,2}, LONG Zhong-Ying^{1,2}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Fujian Provincial Key Laboratory of Marine Fishery Resources and Eco-environment, Xiamen 361021, China)

Abstract With the rapid development of modern industry, a large amount of carbon dioxide emissions have caused apparent acidification of the oceans, which not only results in the global warming, but also seriously endangers the ecological health of marine life. The effects of pH change on oxygen consumption rate, ammonia emission rate, gill tissue structure, immune and antioxidant enzyme activities of the gill and visceral mass of *Ruditapes philippinarum* were studied. The *R. philippinarum* was exposed to acidified seawater (pH 6.4, 7.1, and 7.7) compared to natural seawater (pH 8.1). Results showed oxygen consumption rate and ammonia excretion rate decreased with the increase or decrease of pH, and reached the maximum value at pH=8. In the 6.4 acidification group severe damage to the gill tissue structure, enlarged gill filament spacing, and cilium bonding. The activity of alkaline phosphatase (AKP) in gill tissue of 42-day all acidification groups were significantly greater than those of the control ($P<0.05$), less acidic phosphatase (ACP) and lysozyme (LZM) activity than control ($P<0.05$) in all acidification groups; the activity of superoxide dismutase (SOD), total antioxidant capacity (T-AOC), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GSH-Px) were significantly higher than control group ($P<0.05$) in 7.7 acidification group, in all acidification groups compared with the control group malondialdehyde (MDA) levels were significantly inferior ($P<0.05$); the activity of visceral LZM were significantly outdistance the control group ($P<0.05$) in 7.1 and 7.7 acidification groups, in all acidification groups T-AOC and SOD activity were significantly different from the control group ($P<0.05$), compared with the control group MDA was far from sufficient ($P<0.05$) in 7.1 and 7.7 acidification groups. Acidification reduces the rate of oxygen consumption rate and ammonia excretion rate of *R. philippinarum*, slows down their physiological activity, reduces the immune and antioxidant enzyme activities of gill tissue, breaks the original metabolic level of *R. philippinarum* and increases the possibility of disease.

Key words pH; *Ruditapes philippinarum*; oxygen consumption rate; ammonia excretion rate; immunity; antioxidant