

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201223003

http://www.yykxjz.cn/

荣小军, 李彬, 廖梅杰, 王印庚, 王治平, 王锦锦, 于永翔, 张正, 范瑞用. 刺参“参优 1 号”苗种在不同 pH 条件下的代谢特征和适应性研究. 渔业科学进展, 2021, 42(3): 116-124

Rong XJ, Li B, Liao MJ, Wang YG, Wang ZP, Wang JJ, Yu YX, Zhang Z, Fan RY. Metabolic characteristics and adaptability of a new variety of sea cucumber “Shenyou No.1” under different pH conditions. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(3): 116-124

刺参“参优 1 号”苗种在不同 pH 条件下的代谢特征和适应性研究*

荣小军^{1,2} 李彬^{1,2} 廖梅杰^{1,2①} 王印庚^{1,2} 王治平^{1,2}
王锦锦^{1,2} 于永翔^{1,2} 张正^{1,2} 范瑞用³

- (1. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071;
3. 青岛瑞滋集团有限公司 青岛 266408)

摘要 为研究刺参(*Apostichopus japonicus*)“参优 1 号”苗种的适宜 pH 及耐受范围并解析其对水体的酸碱适应性机制, 本研究测定了 pH 6.5~10.0 条件下该良种苗种的生长、存活、呼吸代谢以及非特异性免疫酶活性的差异。结果显示, 在 pH 6.5~9.5 范围内, 30 d 实验周期内苗种的存活率均为 100%, 而在 pH 10.0 条件下苗种全部死亡。在 pH 7.5~8.5 范围内, 苗种特定生长率(SGR)为正值, 且在 pH 为 8.0 时 SGR 最高, 达到 0.541%/d, 而在 pH 低于 7.0 和高于 9.0 时, SGR 为负值, 苗种为负生长。对不同 pH 条件下的耗氧率(R_O)和排氮率(R_N)的测定结果显示, 随 pH 的变化, R_O 和 R_N 均呈现以 pH 8.0 为波谷的“V”型变化, 在 pH 8.0 条件下的 R_O 和 R_N 分别为 19.07 和 1.34 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 。不同 pH 实验组刺参苗种的氧氮比(O/N)均在 11 左右, O/N 随 pH 变化无显著差异($P>0.05$)。pH 的升高和降低会引起刺参体腔液中酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、溶菌酶和超氧化物歧化酶的活性显著升高($P<0.05$), 在苗种适应 pH 胁迫过程中, 各 pH 组超氧化物歧化酶活性的峰值一般在第 0 天出现, 而溶菌酶的活性峰值在第 10 天出现。研究表明, 刺参“参优 1 号”可存活的 pH 范围为 6.5~9.5, 适宜生长的 pH 范围为 7.5~8.5, pH 变化会导致苗种呼吸代谢和免疫酶活性的改变。本研究结果将为刺参“参优 1 号”苗种的科学化推广提供依据。

关键词 刺参“参优 1 号”; 酸碱度适应; 生长与存活; 呼吸代谢; 非特异性免疫酶活性

中图分类号 S966.9 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)03-0116-09

刺参(*Apostichopus japonicus*)自然分布于太平洋西部的中国、俄罗斯、韩国与日本沿海(廖玉麟, 1997)。20 世纪 80 年代, 刺参人工育苗技术突破后, 刺参养殖业迅猛发展, 目前已成为引领我国第五次海水养殖

* 国家重点研发计划课题(2018YFD0901604)、中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2020TD40; 20603022020020)和山东省农业良种工程重大课题(2020LZGC015)共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Program of China(2018YFD0901604), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD40; 20603022020020), and Agriculture Seed Improvement Project of Shandong Province (2020LZGC015)]. 荣小军, E-mail: rongxj@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 廖梅杰, 研究员, E-mail: liaomj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2020-12-23, 收修改稿日期: 2021-01-09

浪潮的主要品种。然而,近年来随着产业规模的急剧扩大,养殖过程中出现的种质退化、疾病频发、产品质量安全等问题日益突出,对刺参养殖的可持续发展构成巨大威胁(王印庚等,2014)。刺参良种选育和规模化推广是解决上述问题的重要手段之一。中国水产科学研究院黄海水产研究所采用群体选育方法,以抗病力和生长速度为选育目标,经过累代选育,培育出生长速度快、抗病力强、成活率高的刺参“参优1号”新品种(GS-01-016-2017),为刺参养殖种质提升提供了种质基础。然而,生物的性状表现是环境和基因共同作用的结果,我国海参养殖区域跨度大、养殖模式多样、水域环境复杂,要充分发挥良种的种质潜力,需要对其生态适应性进行科学评价,相应结果也将有助于良种最适养殖区和养殖模式的确定,进而为获得最佳良种增产贡献率提供科学指导。

pH 是水体环境的关键指标,研究表明,pH 的升高或降低会对鱼、虾、贝、参等水生动物的存活、生长和免疫酶活性产生直接影响(王双耀等,2013;王芸等,2013;文春根等,2009;韩莎等,2018a)。在池塘养殖过程中,因天气、浮游藻类繁殖、池底大型藻类生长、底质老化、人工投饵或微生物制剂使用等因素的影响,养殖水体的pH值常会发生波动或剧烈变化,监测结果表明,池塘养殖水体的pH值在4.0~10.0范围内大幅度波动(韩莎等,2018b)。近年来,在外海海域,受海洋酸化、赤潮、绿潮等影响,外海的pH值也会发生大幅波动。随着刺参养殖产业的发展,尤其是“东参西养”和“北参南养”模式的快速发展,刺参养殖区从最初的自然分布区逐步拓展到黄河三角洲地区和闽浙沿海,刺参的养殖模式涉及外海底播增殖、滩涂的围堰养殖、池塘养殖以及陆基的工厂化养殖等多种模式,养殖用水的pH受相应因素的影响波动较大,pH值变化会对良种的生理、生长及优良性状的表现产生影响。本研究测定了不同pH条件下刺参“参优1号”的生长、存活、呼吸代谢以及非特异性免疫酶活性变化,旨在探明“参优1号”对pH的适应性,分析不同pH条件下“参优1号”苗种的生长、呼吸代谢和免疫等特征变化,进而确定其最适pH条件及其耐受机制,为该良种的推广提供理论依据和参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用刺参苗种为2019年中国水产科学研究院黄海水产研究所在青岛瑞滋集团有限公司培育

的“参优1号”苗种,平均规格为(5.00±0.75)g/头。选取活力良好的个体,在水槽中暂养7d后进行实验。

1.2 实验方法

根据刺参对pH的耐受特点和各养殖模式下海水的pH变化范围,本研究设8个pH梯度:6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5和10.0。实验所用海水以砂滤洁净海水为基础,利用NaOH或HCl调节至相应pH,采用pH测定仪测定相应pH,配制好的海水分别储备在单独的1m³的聚丙烯水槽中。各pH实验组所用养殖水槽为塑料水槽,水槽容积为30L。以自然海水pH值为基础,按照每天降低或升高0.5个pH对实验用海水进行酸碱度的梯度降低或升高。每个pH实验设置4个平行,每个平行放置30头刺参,其中3个平行用于测定相应实验条件下苗种的生长和存活,另外1个平行用于呼吸代谢和酶活性测定样品的获取。实验期间的养殖管理:每天投喂配合饲料1次,按照刺参体重的2%投喂,每天定时吸底、清污并补充相同pH的储存海水,换水量为50%。实验期间,每天观察并记录各实验组刺参的摄食、运动状况,及时挑出化皮死亡个体并绘制存活率曲线。根据实验前后刺参存活的个体数和平均体重计算各组存活率(Survival rate, SR)和特定生长率(Specific growth rate, SGR),设置相同的实验条件,在第7天测定各组刺参的呼吸代谢,在0、10、20和30d自各实验组中随机抽取刺参苗种,测定其非特异性免疫酶活性。

1.2.1 不同pH条件下刺参“参优1号”苗种的特定生长率和存活率 实验开始时,测定并计算苗种的初始平均体重。实验过程中,每天观察并记录苗种的存活数量,绘制存活率曲线图。实验结束时,测定并计算终末平均体重,采用以下公式计算苗种的存活率和特定生长率:

$$\text{存活率(SR)} = N_t / N_0 \times 100\%$$

$$\text{特定生长率(SGR)} = (\ln W_t - \ln W_0) \times 100 / t$$

式中, N_0 和 N_t 分别为刺参初始苗种数量和终末存活苗种数量, W_0 和 W_t 分别为刺参苗种的初始平均体重和苗种的终末平均体重(g), t 为养殖天数。

1.2.2 不同pH条件下刺参“参优1号”苗种的呼吸代谢 各组到达设定的pH条件的第7天测定各实验组刺参的呼吸代谢,实验在2L呼吸瓶中进行,每个测试瓶中加入相应pH的海水和刺参,每个pH梯度设3个平行组,每组10头刺参,同时设置3个不添加刺参苗种的呼吸瓶作为空白对照组。所有呼吸瓶放入同一个温度为16℃的水槽中以保持相同的温度环境条件(章龙珍等,2009)。每个呼吸瓶放入刺参苗

种并加满相应 pH 的储存海水后,立即用橡皮塞封口,封口 4 h 后用虹吸法收集各呼吸瓶中的水样,用碘量法(GB17378.4-2007)和次溴酸钠氧化法(GB17378.4-2007)测定各样品中的溶解氧(DO)和氨氮(NH₃-N)浓度,根据如下公式计算相应 pH 条件下刺参的耗氧率(R_O)和排氮率(R_N),并进一步测算其氧氮比(O/N)。

$$\text{耗氧率}(R_O)=[(O_0-O_t)V]/(W\times t)$$

$$\text{排氮率}(R_N)=[(N_t-N_0)V]/(W\times t)$$

$$\text{氧氮比}(O/N)=(R_O/16)/(R_N/14)$$

式中, O_t 和 O_0 为实验结束时实验组和对照组水体的溶解氧浓度(mg/L), N_t 和 N_0 分别为实验结束时实验组和对照组水体的氨氮浓度(mg/L), t 为实验周期(h); W 为参与测试的刺参苗种的体重(g), V 为实验的水体体积(L)。

1.2.3 不同 pH 条件下刺参“参优 1 号”苗种的非特异性免疫酶活性变化 本研究实验周期为 30 d,分别在 0 d、10 d、20 d、30 d 自各 pH 组中随机抽取 3 头刺参苗种,解剖吸取体腔液,4℃ 条件下,3000 g 离心 10 min,吸取上清液,进行酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、溶菌酶(LZM)和超氧化物歧化酶(SOD)的活性测定,酶指标测定选用南京建成生物公司的试剂盒。

1.3 数据处理

利用 Graphpad Prism 8.0 软件进行图表绘制,用 SPSS 18.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA),多重分析采用 Turkey 检验,按照 $P<0.05$ 对不同 pH 组相应测定指标的差异进行显著性检测。

2 结果与分析

2.1 pH 对刺参“参优 1 号”苗种存活的影响

实验期间,不同 pH 条件下刺参“参优 1 号”苗种的存活率统计结果见图 1。由图 1 可以看出,pH 值对苗种存活影响很大,在 pH 6.5~9.5 条件下,苗种 30 d 存活率均为 100%,且苗种摄食、运动正常,附着力较强,而 pH 10.0 实验组,苗种活力下降,附着力降低,逐渐沉到水槽底部,摄食减少,部分个体出现化皮和死亡现象,到第 4 天苗种全部死亡,死亡率达 100%。

2.2 pH 对刺参“参优 1 号”苗种生长的影响

由于 pH 10.0 条件下测试苗种全部死亡,无法计算实验周期内苗种的 SGR,对 pH 6.5~9.5 各实验组苗种的 SGR 计算结果见图 2。由图 2 可以看出,在 pH 6.5~9.5 之间,苗种的 SGR 随 pH 升高呈先升高后

降低的趋势。在 pH 6.5~7.0 之间,苗种的 SGR 为负值;在 pH 7.5~8.5 之间,SGR 为正值,在 pH 9.0~9.5 范围内 SGR 降为负值。在 pH 6.5~8.0 之间,苗种的 SGR 显著升高($P<0.05$),在 pH 8.0~9.5 之间,SGR 逐渐降低。其中,在 pH 8.0 实验组 SGR 最高,最高值为 0.541%/d。

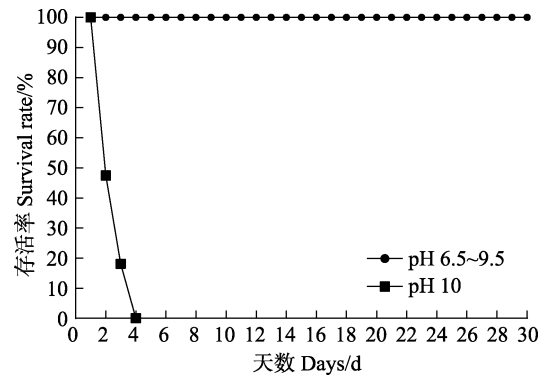


图 1 不同 pH 条件对刺参“参优 1 号”苗种的存活影响
Fig.1 Effect of pH on survival rate of sea cucumber “Shenyou No.1”

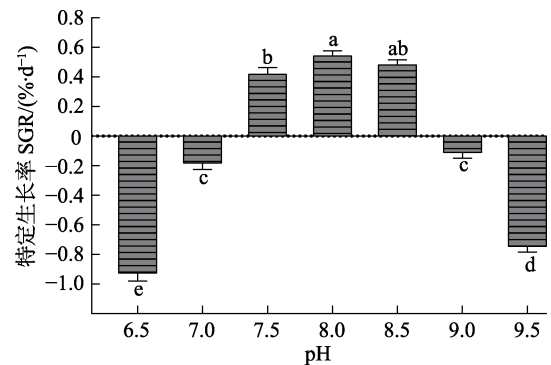


图 2 不同 pH 条件下刺参“参优 1 号”苗种的特定生长率
Fig.2 Specific growth rate of sea cucumber “Shenyou No.1” under different pH

不同字母表示差异显著($P<0.05$),下同
Different letters indicated significant different ($P<0.05$), the same as below

依据所测得的不同 pH 条件下的苗种的 SGR 数据并通过 excel 数据趋势,推导不同 pH 条件下生长率曲线公式,在 pH 6.5~9.5 范围内,pH 和苗种 SGR 的关系可以用以下公式表示: $SGR = -0.6298p^2 + 10.132p - 40.195$ ($R^2 = 0.9892$)。据公式推算出刺参“参优 1 号”在 pH 条件为 8.04 时,将获得最大的 SGR。

2.3 pH 对刺参“参优 1 号”苗种呼吸代谢的影响

不同 pH 条件下刺参“参优 1 号”苗种的 R_O 的测定结果见图 3。由图 3 可知,在 pH 6.5~9.5 范围内,随 pH 的升高 R_O 呈“V”型变化趋势,在 pH 6.5~8.0

范围内, 随着 pH 的上升 R_O 逐渐降低, 并在 pH 8.0 时达最低[19.07 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$]; 在 pH 8.0~9.5 范围内, 随 pH 的升高 R_O 逐渐升高。 R_O 在 pH 6.5 和 pH 9.5 组间无显著差异($P>0.05$), 均处于较高水平。

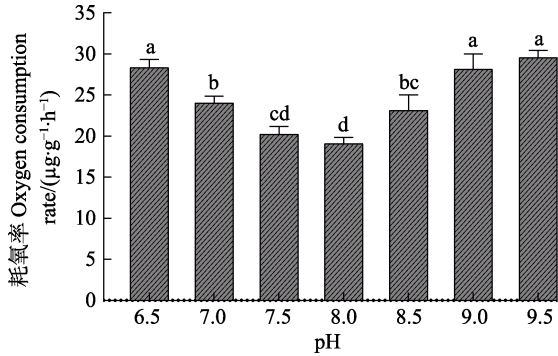


图 3 不同 pH 条件下刺参“参优 1 号”苗种的耗氧率
Fig.3 Oxygen consumption rate of sea cucumber “Shenyou No.1” under different pH

不同 pH 条件下刺参“参优 1 号”苗种的 R_N 的测定结果见图 4。从图 4 可知, 不同 pH 条件下苗种 R_O 变化趋势相似, 在 pH 6.5~9.5 范围内随着 pH 升高, 实验苗种的 R_N 呈“V”型变化趋势, 并在 pH 8.0 时实验组达到最低谷, 最低值为 1.34 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$; 并且苗种 R_N 在 pH 7.5 和 pH 8.5 之间以及 pH 6.5 和 pH 9.5 组间无显著差异($P>0.05$)。

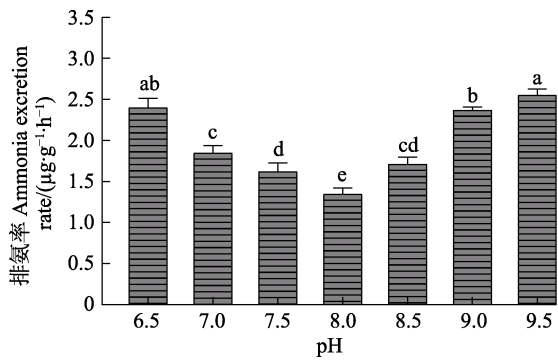


图 4 不同 pH 条件下刺参“参优 1 号”苗种的排氨率
Fig.4 Ammonia excretion rate of sea cucumber “Shenyou No.1” under different pH

根据 R_N 和 R_O 计算不同 pH 条件下刺参苗种的 O/N 结果见表 1。从表 1 可以看出, 不同的 pH 组 O/N 的值均在 11 左右, 在 pH 8.0 组苗种的 O/N 比最高, 为 12.40 ± 1.17 , 但不同 pH 条件下各实验组苗种的 O/N 无显著差异($P>0.05$)。

2.4 pH 对刺参“参优 1 号”苗种非特异性免疫酶活性的影响

由于在 pH 10.0 组实验过程中测试用苗种全部死

亡, 未对该实验组进行体腔液获取和酶指标的测定。本研究对 pH 6.5~9.5 条件下苗种的非特异性免疫酶活性(包括 ACP、AKP、LZM 和 SOD)的测定结果见图 5~图 8。

表 1 pH 对刺参“参优 1 号” O/N 的影响

Tab.1 Effect of pH on O/N of sea cucumber “Shenyou No.1”

pH	O/N
6.5	10.33 ± 0.89
7.0	11.40 ± 0.18
7.5	10.91 ± 0.25
8.0	12.40 ± 1.17
8.5	11.83 ± 1.51
9.0	10.39 ± 0.58
9.5	10.15 ± 0.16

对各实验组 ACP 酶活力的测定结果见图 5, pH 为 8.0 的实验组, 在实验周期内的各时间点刺参“参优 1 号”苗种的 ACP 活性无显著变化($P>0.05$), 其余实验组 ACP 活性随养殖时间的延长呈波动起伏趋势。对比相同时间节点不同 pH 条件实验组的酶活力结果可以看出, 随着 pH 的升高 ACP 活性呈“V”型波动趋势, 且在 pH 8.0 时达到最低值。

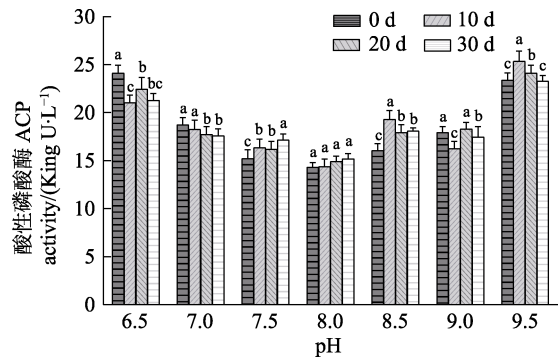


图 5 pH 对刺参“参优 1 号”体腔液 ACP 活性的影响
Fig.5 Effect of pH on ACP activity of coelomic fluid in sea cucumber “Shenyou No.1”

对各实验组苗种 AKP 酶活力的测定结果见图 6, 在 pH 6.5~9.5 范围内, AKP 的活性受 pH 影响变化显著, 在 pH 6.5~8.0 范围内, AKP 的活性随 pH 升高而逐渐降低, 并在 pH 为 8.0 时达到最低值, 且 pH 8.0 实验组不同时间点刺参“参优 1 号”苗种的 AKP 活力没有显著变化($P>0.05$); 在 pH 8.0~9.5 范围内, AKP 的活性随 pH 升高而逐渐升高。

不同 pH 对刺参“参优 1 号”体腔液中 LZM 活性的影响见图 7。从图 7 可以看出, 在 pH 6.5~8.0 范围内, LZM 的活性随 pH 升高而逐渐降低, 并在 pH

为 8.0 时达到最低值,且 pH 8.0 实验组不同时间点刺参“参优 1 号”苗种的 LZM 活力没有显著变化($P>0.05$),pH 8.0~9.5 范围内,LZM 的活性随 pH 升高而逐渐升高;除 pH 8.0 组外,其他实验组 LZM 的活性随时间均呈先升高再降低的趋势,并在第 10 天到达到峰值。

不同 pH 对刺参“参优 1 号”体腔液中 SOD 活性的影响见图 8。从图 8 可以看出,在 pH 6.5~9.5 范围内,0 d 和 10 d 时 SOD 活性随 pH 的升高呈“V”型变化趋势,最低值在 pH 8.0;20 d 和 30 d 时 pH 的

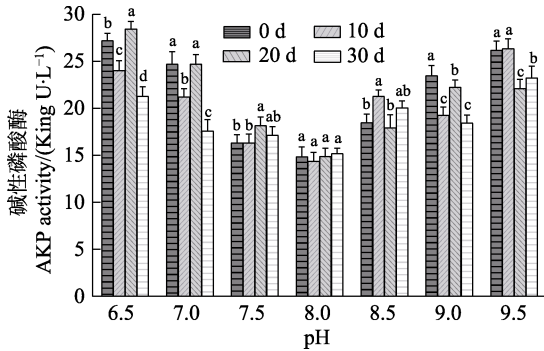


图 6 pH 对刺参“参优 1 号”体腔液 AKP 活性的影响

Fig.6 Effect of pH on AKP activity of coelomic fluid in sea cucumber “Shenyou No.1”

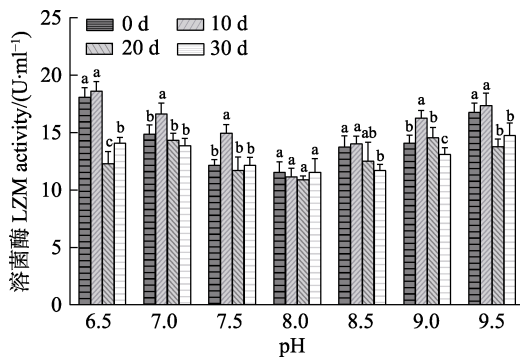


图 7 pH 对刺参“参优 1 号”体腔液 LZM 活性的影响

Fig.7 Effect of pH on LZM activity of coelomic fluid in sea cucumber “Shenyou No.1”

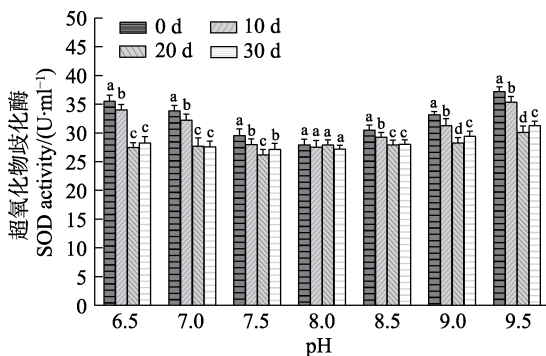


图 8 pH 对刺参“参优 1 号”体腔液 SOD 活性的影响

Fig.8 Effect of pH on SOD activity of coelomic fluid in sea cucumber “Shenyou No.1”

变化对 SOD 的活性影响相对较小;pH 8.0 实验组在实验周期内的不同时间点,刺参“参优 1 号”苗种的 SOD 活力变化不显著($P>0.05$);此外,各实验组 SOD 活性均在 0 d 时最高,在第 10 天时活性呈降低趋势,在 20 d 和 30 d 时活性较低。

3 讨论

3.1 刺参“参优 1 号”苗种在不同 pH 条件下的适应性

水体 pH 值是水产养殖过程中的一个重要的环境因子,pH 的高低直接影响水生动物的生长及生理代谢(曹善茂等, 2015; Hu *et al.*, 2015)。刺参在 pH 不适时会出现棘刺收缩、身体卷曲、粪便变细变短、池底的残饵量增加等现象。在刺参养殖过程中,水体中的 pH 会因养殖管理、酸雨和水质污染等因素的影响而产生波动,而且不同池塘 pH 也存在差异,对水产新品种而言,选育目标性状决定了其在养殖业中的应用潜力,而新品种生态适应性则决定了其推广范围和区域。刺参“参优 1 号”是以抗灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)能力和生长速度为选育目标培育出的刺参新品种,为获得最大的良种贡献率,需要对该品种的酸碱度适应范围进行评估,以期根据不同区域养殖水域 pH 范围进行合理推广,从而发挥良种的最大贡献率。

水产动物对 pH 的适应范围存在物种的差异。相关研究表明,黄颡鱼(*Pseudobagrus fuvliraco*)在 pH 7.0~8.0 范围内生长较好(崔平等, 2018),缢蛏(*Sinonovacula constricta*)在 pH 7.5~9.5 可正常存活(叶博等, 2019),中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)在幼蟹时期适宜的 pH 范围为 8.0~9.0(刘金生等, 2016)。在本研究中,pH 10.0 实验组第 4 天苗种全部死亡,是由于水体碱性过高,刺参出现急性中毒现象;在 pH 7.5~8.5 之间苗种呈正生长,超出或低于此范围,苗种呈现负增长。研究表明,pH 值过高或过低导致海洋生物生长发育缓慢,是因为酸碱度的变化导致生物体内渗透压发生改变,为了维持体内的酸碱平衡,必然会转移部分用于其他生理过程的能量进行反馈补偿性代谢,从而影响了生物其他的正常生理活动,导致生长发育变慢(湛垚垚等, 2013)。刘洋等(2020)研究发现,海湾扇贝(*Argopecten irradians*)幼虫在 pH 低于 7.6 的条件下出现生长停滞现象。Asha 等(2005)研究发现,尖塔海参(*Holothuria spinifera*)幼虫的最适生存 pH 为 7.8,在 pH 达到 9.0 的时候实验个体已全部死亡。本研究缓慢调节 pH 后 30 d 的养殖实验结果表明,刺参“参优 1 号”的存活 pH 为 6.5~9.5,最适生长 pH 为 7.5~8.5。韩莎等(2018b)研究表明,青岛国家海洋科研中心选育

的刺参苗种适宜生长的 pH 范围为 7.6~8.8, 与本研究成果相近。Luo 等(2019)调研了大连刺参养殖池塘的 pH 年变化范围为 7.86~8.38, 表明该地酸碱度符合“参优1号”苗种的 pH 适应性, 有利于良种优势性状的发挥。

3.2 刺参“参优1号”在不同 pH 条件下的呼吸代谢特征

pH 波动会对水生生物产生一定的刺激, 从而导致呼吸代谢变化(Stumpp *et al.*, 2011、2012)。曹善茂等(2015)研究表明, 中华原钩虾(*Eogammarus sinensis*)在最适 pH 范围内的 R_O 和 R_N 均处在较高水平, Savant 等(1995)的研究也呈现相同的趋势。而朱爱意等(2007)研究显示, 褐菖鲉(*Sebastes marmoratus*)在最适 pH 范围内的 R_O 和 R_N 相对较低, 在 pH 不适时 R_O 和 R_N 会提高。本研究结果显示, pH 8.0 实验组刺参的 R_O 和 R_N 最低, pH 偏移会使 R_O 和 R_N 上升, 是由于在适宜的 pH 下, 机体的基础代谢较低, 耗能较少; 在 pH 胁迫下, 机体需要消耗更多的能量去维持体内的内环境平衡, 此趋势与章龙珍等(2009)对长鳍篮子鱼(*Siganus canaliculatus*)幼鱼的研究结果类似。

氧氮比(O/N)是反映生物对环境适应情况和营养物质供能情况的指标(Ikeda, 1974), 不同的生物之间 O/N 受 pH 影响的变化趋势存在差异。O/N 表示生物体内蛋白质、脂肪和碳水化合物分解代谢之间的关系(曹善茂等, 2015)。Mayzalld(1976)提出, O/N 约为 7 时, 生物体能量完全由蛋白质氧化提供; Ikeda (1974)认为, O/N 约为 24 时, 生物体所需能量由蛋白质和脂肪氧化提供; 如果主要由脂肪或碳水化合物提供, O/N 将变为无穷大(Conover *et al.*, 1968)。相关研究表明, 中华小长臂虾(*Palaemonetes sinensis*)在 pH 4.0~9.0 之间 O/N 呈波动趋势, pH 的升高会使长肋日月贝(*Amusium pleuronectes*)的 O/N 升高, 在 pH 7.7 和 pH 8.7 的水体中文蛤(*Meretrix meretrix*)O/N 显著高于 pH 6.7 和 pH 9.7(姜宏波等, 2017; 严俊贤等, 2018; 杨杰青等, 2016)。本研究表明, pH 的变化对刺参 O/N 无显著影响, 说明 pH 的变化不会改变刺参代谢底物, 与上述研究结果不同的原因可能由于物种差异所致。

3.3 刺参“参优1号”苗种在不同 pH 条件下的免疫酶活性特征

水体中 pH 过高或者过低会影响刺参体腔液的酸碱度, 直接影响其各种生理过程。另外, pH 变化还会导致有益微生物的大量死亡, 病原菌及有害生物的

大量繁殖打破了水体中的生态平衡, 进而间接影响到刺参机体的代谢和免疫过程。研究表明, pH 胁迫会影响水产动物免疫酶的活性(魏炜等, 2001; 王维娜等, 2002), 因此, 可以通过检测刺参体内主要免疫酶的活性来反映对 pH 的适应情况。ACP 和 AKP 是动物体内参与免疫防御等活动的 2 种重要的水解酶, 是溶酶体酶的重要标志酶(文春根等, 2009)。超氧化物歧化酶(SOD)是生物体内重要的抗应激酶, 它可以将机体内过多的 O_2^- 催化生成 H_2O_2 和 O_2 , 从而起到保护机体的作用(Sui *et al.*, 2016)。本研究结果表明, pH 变化显著影响了刺参“参优1号”的 ACP、AKP、LZM 和 SOD 活性。从相同 pH 条件下 30 d 实验期内酶指标的测定结果可以看出, LZM 活性在第 10 天最高, SOD 活性在第 0 天最高, 而后开始降低, ACP 和 AKP 则随时间延长呈波动变化, 表明刺参体腔细胞在应对 pH 变化过程中, 不同酶指标的变化响应时间存在差异性。Gullian 等(2017)研究发现, 墨西哥海参体内的 SOD 在 pH 7.7 的时候活性较高。Zhao 等(2010)通过添加酵母多糖进行 pH 胁迫(pH 为 5.5 和 10.0) 24 h 后, 使 LSZ 和 ACP 活性升高, 但其仅代表 24 h 的数据, 并未验证该 pH 条件下海参能否长期存活。赵先银等(2011)研究发现, 对虾的多种酶活性对不同 pH 条件的响应时间也存在差异。从不同的 pH 组之间酶指标的测定结果可以看出, 4 种免疫酶的活性均在最适生长的 pH 8.0 实验组最低, 随着 pH 的偏移, 4 种免疫酶活性均出现升高趋势, 变化趋势与付监贵等(2016)对日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)的研究结果类似; 樊甄姣等(2006)对栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)的研究也发现, 在 pH 7.0~9.0 之间, 实验组呈现出随 pH 偏移, 各种酶活性升高的现象; 文春根等(2009)研究发现, 无齿蚌(*Anodonta woodiana*)体内的多种免疫酶活性随 pH 的改变而出现波动变化, 可能是为避免环境对机体的损伤而发生的免疫调节反应, 也可能是由“毒物兴奋效应”所导致(Calabrese *et al.*, 2005)。

综上所述, 在刺参“参优1号”苗种养殖生产过程中应保持水体 pH 在 7.5~8.5 范围内, 苗种生长速度较快, pH 过高或过低均会引起刺参的应激反应, 表现为生长下降和存活率降低等现象, 生理指标表现为 R_O 和 R_N 升高以及免疫酶活性发生变化。因此, 在良种推广过程中, 应根据相应海域或养殖模式下的 pH 周年变化范围, 选择适宜的推广区域并控制养殖管理工艺, 避免暴雨、水体污染等自然或人为因素造成 pH 大幅波动, 保障良种在适宜的环境条件下生长, 以获得最佳的良种贡献率。

参 考 文 献

- Asha PS, Muthiah P. Effects of temperature, salinity and pH on larval growth, survival and development of the sea cucumber *Holothuria spinifera* Theel. *Aquaculture*, 2005, 250(3-4): 823-829
- Calabrese E, Cook R. Hormesis: How it could affect the risk assessment process. *Human and Experimental Toxicology*, 2005, 24(5): 265-270
- Cao SM, Song B, Wang LM, *et al.* Effect of temperature, salinity and pH on respiration and excretion in gammarid *Eogammarus sinensis*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2015, 30(5): 519-532 [曹善茂, 宋博, 王利明, 等. 温度、盐度和 pH 对中华原钩虾呼吸和排泄的影响. *大连海洋大学学报*, 2015, 30(5): 519-523]
- Conover RJ, Corner DES. Respiration and nitrogen excretion by some marine zooplankton in relation to their life cycles. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1968, 48(1): 49-75
- Cui P, Qiang J. Growth and hepatic SOD activity of darkbarbel catfish *Pelteobagrus vachelli* under influences of water pH and ammonia nitrogen. *Freshwater Fisheries*, 2018(4): 39-44 [崔平, 强俊. pH 与氨氮对黄颡鱼幼鱼生长与肝脏超氧化物歧化酶的影响. *淡水渔业*, 2018(4): 39-44]
- Fan ZJ, Yang AG, Liu ZH, *et al.* Effect of pH on the immune factors of *Chlamys farreri*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(4): 650-654 [樊甄姣, 杨爱国, 刘志鸿, 等. pH 对栉孔扇贝体内几种免疫因子的影响. *中国水产科学*, 2006, 13(4): 650-654]
- Fu JG, Zhang LL, Xu L, *et al.* Effects of pH on survival of oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) and activities of liver function enzymes. *Freshwater Fisheries*, 2016, 46(5): 100-104 [付监贵, 张磊磊, 徐乐, 等. pH 对日本沼虾存活及肝功能相关酶活性的影响. *淡水渔业*, 2016, 46(5): 100-104]
- Gullian KM, Terrats PM. Effect of pH on temperature-controlled degradation of reactive oxygen species, heat shock protein expression, and mucosal immunity in the sea cucumber *Isostichopus badionotus*. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0175812
- Han S, Hu W, Li CL, *et al.* Effect of pH stress on growth and activities of immune enzyme of different-sized sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka. *Marine Sciences*, 2018a, 42(11): 51-58 [韩莎, 胡炜, 李成林, 等. pH 胁迫对不同规格刺参生长及免疫酶活性的影响. *海洋科学*, 2018a, 42(11): 51-58]
- Han S, Hu W, Li CL, *et al.* Effects of pH stress on survival rate, growth and antioxidant enzyme activities of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka. *Progress in Fishery Sciences*, 2018b, 39(5): 91-98 [韩莎, 胡炜, 李成林, 等. pH 胁迫对刺参存活、生长及抗氧化酶活性的影响. *渔业科学进展*, 2018b, 39(5): 91-98]
- Hu M, Li L, Sui Y, *et al.* Effect of pH and temperature on antioxidant responses of the thick shell mussel *Mytilus coruscus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015, 46(2): 573-583
- Ikeda T. Nutrition ecology of marine zooplankton. *Memoirs of the Faculty of Fisheries Hokkaido University*, 1974, 22(1): 1-97
- Jiang HB, Bao J, Jiang CJ, *et al.* Effects of pH on survival and respiratory metabolism of Chinese grass shrimp (*Palaemonetes sinensis*). *Chinese Journal of Zoology*, 2017, 52(2): 322-330 [姜宏波, 包杰, 姜春玖, 等. pH 对中华小长臂虾存活及呼吸代谢的影响. *动物学杂志*, 2017, 52(2): 322-330]
- Liao YL. *Fauna Sinica Echinodermata Holothuroidea*. Beijing: Science Press, 1997, 148-150 [廖玉麟. *中国动物志 棘皮动物门 海参纲*. 北京: 科学出版社, 1997, 148-150]
- Liu JS, Wang J, Yue WC, *et al.* The effect of pH on the molting, growth and related gene expression in juvenile mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Freshwater Fisheries*, 2016, 46(4): 96-100 [刘金生, 王军, 岳武成, 等. 水体 pH 对中华绒螯蟹幼蟹蜕壳生长及其相关基因表达的影响. *淡水渔业*, 2016, 46(4): 96-100]
- Liu Y, Yu RH, Zhang Z, *et al.* Effects of different pH on embryo development and larval growth of bay scallop (*Argopecten irradians*). *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(6): 108-114 [刘洋, 于瑞海, 张哲, 等. 不同 pH 对海湾扇贝胚胎发育及幼虫生长发育的影响. *渔业科学进展*, 2020, 41(6): 108-114]
- Luo YM, Cheng Y, Li DH, *et al.* Annual variation of water quality in aquaculture ponds for *Apostichopus japonicus*. *Asian Agricultural Research*, 2019, 11(11): 25-27
- Mayzald P. Respiration and nitrogen excretion of zooplankton IV: The influence of starvation on the metabolism and the biochemical composition of some species. *Marine Biology*, 1976, 37: 47-58
- Savant KB, Amte GK. Influence of some environmental factors on respiratory responses in the tropical estuarine crab *Ilyoplax gangetica*. *Journal of Environmental Biology*, 1995, 16(4): 311-317
- Stumpp M, Trübenbach K, Brennecke D, *et al.* Resource allocation and extracellular acid-base status in the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* in response to CO₂ induced seawater acidification. *Aquatic Toxicology*, 2012, 110-111: 194-207
- Stumpp M, Wren J, Melzner F, *et al.* CO₂ induced seawater acidification impacts sea urchin larval development I: Elevated metabolic rates decrease scope for growth and induce developmental delay. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2011, 160(3): 331-340
- Sui YM, Huang XZ, Kong H, *et al.* Physiological responses to salinity increase in blood parrotfish (*Cichlasoma synspilum* female × *Cichlasoma citrinellum* male). *Springerplus*, 2016, 5(1): 1-12
- Wang SY, Wang X, Jiang ZQ, *et al.* Effects of pH on growth and

- biochemical indices of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). Journal of Guangdong Ocean University, 2013, 33(6): 42–46 [王双耀, 王鑫, 姜志强, 等. pH 值对大菱鲆生长及鱼体生化组成的影响. 广东海洋大学学报, 2013, 33(6): 42–46]
- Wang WN, Sun RY, Wang AL, *et al.* Effect of different environmental factors on the activities of digestive enzymes and alkaline phosphatase of *Macrobrochium nipponense*. Chinese Journal of Applied Ecology, 2002, 13(9): 1153–1156 [王维娜, 孙儒泳, 王安利, 等. 环境因子对日本沼虾消化酶和碱性磷酸酶的影响. 应用生态学报, 2002, 13(9): 1153–1156]
- Wang Y, Li J, Zhang Z, *et al.* Effect of pH and ammonia-N stresses on *HSP90* gene expression of *Fenneropenaeus chinensis*. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34(5): 43–50 [王芸, 李健, 张喆, 等. pH、氨氮胁迫对中国对虾 *HSP90* 基因表达的影响. 渔业科学进展, 2013, 34(5): 43–50]
- Wang YG, Rong XJ, Liao MJ, *et al.* Sea cucumber culture and disease control technology. Beijing: China Agriculture Press, 2014 [王印庚, 荣小军, 廖梅杰, 等. 刺参健康养殖与病害防控技术丛解. 北京: 中国农业出版社, 2014]
- Wei W, Zhang HY, Shi AJ. The study of relationship between acid phosphatase activity and oyster defence. Acta Hydrobiologica Sinica, 2001(4): 413–415 [魏炜, 张洪渊, 石安静. 育珠蚌酸性磷酸酶活力与免疫反应关系的研究. 水生生物学报, 2001(4): 413–415]
- Wen CG, Zhang LH, Hu BQ, *et al.* Effect of pH on the five immune factors of *Anodonta woodiana*. Journal of Nanchang University (Natural Science), 2009, 33(2): 172–176 [文春根, 张丽红, 胡宝庆, 等. pH 对背角无齿蚌 (*Anodonta woodiana*) 5 种免疫因子的影响. 南昌大学学报(理科版), 2009, 33(2): 172–176]
- Yan JX, Chen MQ, Wu KC, *et al.* Effect of salinity and pH on oxygen consumption rate and ammonia excretion rate in Asian moon scallop *Amusium pleuronectes*. Fisheries Science, 2018, 37(2): 181–186 [严俊贤, 陈明强, 吴开畅, 等. 盐度和 pH 对长肋日月贝耗氧率和排氨率的影响. 水产科学, 2018, 37(2): 181–186]
- Yang JQ, Jiang M, Li L, *et al.* Effects of pH and salinity on respiration and excretion in *Meretrix meretrix*. Marine Fisheries, 2016, 38(4): 406–414 [杨杰青, 蒋玫, 李磊, 等. pH、盐度对文蛤呼吸与排泄的影响. 海洋渔业, 2016, 38(4): 406–414]
- Ye B, Cheng ZY, Peng MX, *et al.* Effects of pH and carbonate alkalinity on survival rate, Na^+/K^+ -ATPase activity and phagocytic ability of the razor clam (*Sinonovacula constricta*). Journal of Fisheries of China, 2019, 43(8): 1724–1732 [叶博, 程之扬, 彭茂潇, 等. 急性 pH 和碳酸盐碱度对缢蛏存活率, Na^+/K^+ -ATPase 活性及血淋巴吞噬能力的影响. 水产学报, 2019, 43(8): 1724–1732]
- Zhan YY, Huang XY, Duan LZ, *et al.* Review on the impacts of ocean acidification on nearshore marine life. Journal of Dalian University, 2013, 34(3): 79–84 [湛焱焱, 黄显雅, 段立柱, 等. 海洋酸化对近岸海洋生物的影响. 大连大学学报, 2013, 34(3): 79–84]
- Zhang LZ, Yang JH, Liu JY, *et al.* Effects of water temperature, salinity, pH, and anaesthetics on oxygen consumption rate of juvenile *Siganus canaliculatus*. Chinese Journal of Ecology, 2009, 28(8): 1494–1498 [章龙珍, 杨金海, 刘鉴毅, 等. 温度, 盐度, pH 和麻醉剂对长鳍篮子鱼幼鱼耗氧率的影响. 生态学杂志, 2009, 28(8): 1494–1498]
- Zhao W, Liang M, Zhang P. Effect of yeast polysaccharide on the immune function of juvenile sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka under pH stress. Aquaculture International, 2010, 18(5): 777–786
- Zhao XY, 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. 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. 上海海洋大学学报, 2011, 20(5): 720–728]
- Zhu AY, Zhao XJ, Fu J. Study on the oxygen consumption rate and asphyxiation point of *Sebastiscus marmoratus*. Marine Fisheries Research, 2007, 28(1): 95–100 [朱爱意, 赵向炯, 付俊. 褐菖鲉耗氧率及窒息点的初步研究. 海洋水产研究, 2007, 28(1): 95–100]

(编辑 马瑾艳)

Metabolic Characteristics and Adaptability of a New Variety of Sea Cucumber “Shenyou No.1” under Different pH Conditions

RONG Xiaojun^{1,2}, LI Bin^{1,2}, LIAO Meijie^{1,2①}, WANG Yingeng^{1,2}, WANG Zhiping^{1,2},
WANG Jinjin^{1,2}, YU Yongxiang^{1,2}, ZHANG Zheng^{1,2}, FAN Ruiyong³

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 3. Qingdao Ruizi Company, Qingdao 266408)

Abstract To determine the optimal pH conditions and pH adaptation mechanisms of the juveniles new sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) variety "Shenyou No.1", the differences in the growth, survival, respiratory metabolism, and immunoenzyme activity were analyzed under conditions of different pH (range: 6.5~10.0). The results showed that in the pH range of 6.5~9.5, the survival rate of the juveniles was 100% during the 30 days experimental period, whereas all juveniles died at pH 10.0. Within the pH range of 7.5~8.5, the juveniles showed a positive specific growth rate (SGR), and the highest SGR was 0.541%/d at pH 8.0, while the SGR was negative at the pH lower than 7.0 or higher than 9.0. The oxygen consumption rate (R_O) and ammonia excretion rate (R_N) were the lowest at pH 8.0, 19.07 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$ and 1.34 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$ for R_O and R_N , respectively. The oxygen-nitrogen ratios of the juveniles in different pH groups were approximately 11, and did not differ significantly with a pH change. The activities of acid phosphatase, alkaline phosphatase, lysozyme, and superoxide dismutase in the coelomic fluid of *A. japonicus* significantly increased at different pH values. While adapting to pH stress, the superoxide dismutase activity in each pH group generally peaked at 0 d, while the lysozyme activity peaked at 10 d. The survival pH of "Shenyou No.1" ranged between 6.5~9.5, and the optimal pH for growth ranged between 7.5~8.5. Our results show that the changes in the pH lead to changes in respiratory metabolism and immune enzyme activity in "Shenyou No.1." These results provide the basis for the popularization of the new sea cucumber variety "Shenyou No.1".

Key words Sea cucumber “Shenyou No.1”; pH adaptation; Growth and survival; Respiratory metabolism; Nonspecific immune enzyme activities

① Corresponding author: LIAO Meijie, E-mail: liaomj@ysfri.ac.cn