

DOI:10.3969/j.issn.1007-9580.2021.06.009

不同 pH 对红螯螯虾胚胎离体孵化的影响

韦永春^{1,2,3}, 程 顺², 贾永义², 迟美丽², 刘士力²,
郑建波², 李 飞², 刘一诺², 顾志敏^{1,2,3}

(1 上海海洋大学农业农村部淡水水产种质资源重点实验室 上海 2013062;

2 浙江省淡水水产研究所, 农业农村部淡水渔业健康养殖重点实验室, 浙江省淡水水产遗传育种重点实验室, 浙江 湖州 313001;

3 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心 上海 2013062)

摘要:为提高红螯螯虾离体胚胎孵化的效果, 提供其大规模离体胚胎孵化基础水质数据, 应用韩国施奇公司(ZISS)孵化器探讨 pH 对红螯螯虾离体胚胎孵化的影响, 设置具体参数如孵出时间(至可自由运动的 3 期幼虾的时间)、出苗量(3 期幼虾数量)、孵化率和出苗率等, 以期筛选出最优 pH 条件。在水温 $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 下, 用梳子剥出 7 对红螯螯虾附肢期胚胎, 经过 3 000 mg/L 甲醛浸泡 15 min, 然后置于 ZISS 孵化器中, 用 30%~40% 的 HCl 和 NaOH 调节水体 pH 为 6.8、7.7、8.4、8.9 和 9.4, 进行离体孵化, 试验共 25 d。结果显示: 各組间孵化率均在 84.0% 以上, 无显著性差异 ($P>0.05$); pH 7.7 组和 pH 8.4 组出苗率显著高于其他 3 组 ($P<0.05$), pH 6.8 组出苗率为 0%, 与 pH 9.4 组无显著性差异 ($P>0.05$), 均显著低于其他 3 组 ($P<0.05$); pH 7.7~9.4 之间出苗率呈下降趋势; pH 的变化不会导致孵化期间胚胎大量死亡, 各 pH 组胚胎死亡高峰集中在第 5 天, 且 pH 6.8 组胚胎孵化时间较长; pH 6.8 组与 pH 9.4 组幼虾出现大量死亡现象, 中间 3 组未出现该现象, 出苗集中在第 19 天和第 25 天。在 pH 为 6.8~9.4 范围内, 红螯螯虾离体胚胎孵化率不受 pH 影响, pH 过低会造成胚胎孵化时间延长, 造成孵化后的幼虾无法存活, 存在酸中毒的现象, 造成胚胎以及幼虾生理性缺氧, 最终死亡; 而 pH 过高, 钙离子含量降低以及 CO_3^{2-} 中毒可能是造成幼虾最先出现大量死亡的原因。研究表明, 红螯螯虾离体胚胎孵化最适的 pH 为 8.1, 该研究结果对孵化过程中的最适 pH 范围进行了精确化, 有助于提高孵化率和出苗率, 对于实际生产有指导作用。

关键词:红螯螯虾; 胚胎; pH; 离体孵化; 孵化器; 水产养殖

中图分类号: S966.1; S966.12

文献标志码: A

文章编号: 1007-9580(2021)06-0064-08

红螯螯虾 (*Cherax quadricaratus*) (又名澳洲淡水龙虾) 原产于澳大利亚北部和新几内亚南部等热带区域, 具有生长快、养成规格大、可食比例高、肉质口感佳等优点, 是世界名贵经济虾类之一。近年来, 克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 等淡水螯虾类的市场需求急剧增加, 红螯螯虾的产业规模也得以迅速扩大^[1]。

红螯螯虾离体胚胎孵化技术是一种新型生产红螯螯虾幼苗的技术, 该技术主要针对红螯螯虾抱卵孵化胚胎时间过长, 以及抱卵过程存在不确定因素易导致出苗率偏低等实际阻碍产业发展的問題。随着离体胚胎孵化技术的发展, ZISS 孵化器、Hemputin 孵化设备以及运用水流和冲气悬浮

技术已经被证实可用于通讯螯虾 (*Pacifastacus leniusculus*)、红螯螯虾等螯虾离体胚胎的孵化, 其中 ZISS 孵化器、Hemputin 孵化设备可用于大规模生产红螯螯虾红螯螯虾幼苗^[2-9]。ZISS 孵化器主要是利用气举带动水形成反向水流原理, 使红螯螯虾胚胎在一个可控的动态水流中处于不断翻滚状态, 形成的稳定循环水流, 使胚胎均匀而轻柔地翻动, 为胚胎提供一个高氧孵化环境, 且翻动的胚胎基本散开, 可有效抑制病菌的传播。Cheng 等^[6]利用该装置, 红螯螯虾胚胎孵化率在 80% 以上, 一个生产季度共孵出虾苗 10.65 万尾。Hemputin 孵化设备通过模仿抱卵母虾行为, 将孵化架与提供动力的电机连接, 使得孵化孵化架上

收稿日期: 2021-07-28

基金项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”项目(2018YFD0901305); 湖州市乡村振兴专项(2019ZD2028)

作者简介: 韦永春(1994—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 遗传育种。E-mail: 1848813256@qq.com

通信作者: 顾志敏(1963—), 男, 研究员, 研究方向: 水产种质资源与遗传育种。E-mail: guzhimin2006@163.com

的孵化盒前后上下摇动,出苗率从母体孵化的 55% 提高到 65%^[8]。Clive 等^[10]利用 Hemputin 孵化装置(Clive 等将其命名为 AquaVerde Incubator),选取眼点期红螯螯虾的卵,一个批次可平均生产 18 万尾幼虾。从实际生产效果来看,ZISS 孵化器出苗更稳定,缺点在于操作上相对 Hemputin 孵化设备麻烦,应用 Hemputin 在实际操作中更可行。但 Jones 等^[11]学者认为,Hemputin 孵化器的出苗率无法保证,且出苗偏低的原因尚未有明确定论。因此有必要筛选适宜红螯螯虾离体胚胎的孵化条件,而 ZISS 孵化器具有出苗率稳定、体积小、充气方便等特点,可用于筛选红螯螯虾离体胚胎孵化的最佳孵化水质条件。

水体中 pH 的变化对水产动物胚胎的正常孵化与发育具有较大影响。主要表现为:pH 偏低或偏高会导致鱼类胚胎表面软化或溶解,导致胚胎发育延迟或死亡^[12-13];pH 偏低或偏高影响虾酶活性,从而影响虾正常代谢,降低免疫功能,阻碍虾体正常发育^[14-15];pH 过低会导致虾酸中毒,载氧能力下降,表现为生理性中毒^[16],pH 偏高则出现 CO_3^{2-} 中毒(碱中毒)以及水体中钙含量降低^[17-18]。苑彦中^[12]研究认为,红螯螯虾孵化期间 pH 应在 7.0 以上,否则可能孵化困难或孵化期延长。覃玉莲等^[14]发现低 pH 能显著降低克氏原螯虾的免疫功能,其在低 pH 的酸性环境中会出现死亡现象,时间越久,死亡率越高。陶易凡等^[20]证明了高 pH 胁迫对克氏原螯虾代谢会产生影响,同时导致氧化应激,并会对鳃和肝胰腺的组织结构造成损伤,影响其生物学功能。刘宝正等^[21]认为,pH 达到 8.4 以上河蟹蚤状幼体更容易开口摄食。郭成秀等^[22]研究认为,海参适宜的 pH 范围为 7.8~8.7 之间,pH 过低会造成缺氧症,腐蚀呼吸器官,pH 过高、过低都会影响海参摄食。不同发育时期的水产动物适宜的 pH 范围不同,发育早期更易受 pH 影响,因此,在红螯螯虾离体胚胎孵化及后期培育期间,有必要控制水体的 pH,但对于控制 pH 在哪个范围或哪个值等,需要进一步研究。另外,在工厂化养殖方面,已有成熟的调控技术用于调节养殖水体 pH,如朱明瑞等^[23]采用 PID 算法,以占空比方式控制电磁阀添加中和剂,能将水体 pH 控制在需求范围内。在离体孵化实际生产中,可提前将孵化水体利用

Na_2CO_3 、 NaOH 和 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 等进行调节^[24],将 pH 控制在适宜范围内。

本研究采用韩国施奇公司生产的孵卵器(ZISS 孵化器)研究了不同 pH 条件下红螯螯虾离体胚胎孵化与初孵幼虾生长的影响,以期筛选出红螯螯虾离体孵化期间适宜的 pH 范围及最优的 pH 条件,为进行大规模红螯螯虾胚胎的离体孵化提供基础水质数据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究使用的孵化系统为以 ZISS 孵化器为主体的孵化水箱,水箱长 70 cm、宽 50 cm、高 40 cm,1 个水箱放入 3 个 ZISS 孵化器,即为 3 个平行试验组,水箱置于温室水泥池内,通过加热棒控制孵化用水水温。其中作为主体孵化装置的 ZISS 孵化器由孵化桶(容量 500 mL,内径 80 mm,高 250 mm)、过滤海绵、硅胶管、橡胶、空气控制阀、气石、不锈钢网等部件构成(图 1)。具有以下几个优点:(1)通过反气举的方式,提供了水与气的对流,不仅使运行期间循环水流更为稳定柔和,使胚胎均匀而轻柔地翻动,且翻动的胚胎基本散开,可有效抑制病菌的传播,还可提供更足的溶氧,并可有效培育硝化细菌,提高水质;(2)圆弧形的桶底可以保护孵化中的胚胎在翻滚中因水流波动不均或突然冲击导致的损伤;(3)顶部过滤设计可以有效解决因底部过滤棉的粗糙面刺伤胚胎;(4)运用该系统孵化期间需要消毒、挑死胚时 ZISS 孵化器易于取出,且死胚会浮于孵化器水面上层,轻轻倒出水时会与水一起排出,因此,ZISS 孵化器为主体的孵化系统还具有小巧轻便、易于操作并且消毒处理方便的优点。

选用的红螯螯虾抱卵虾体质健康,来源于浙江省淡水水产研究所综合试验基地。水箱加水约 120 L 后,用 30%~40% 的氯化氢(HCl,宜兴市广汇助剂化工厂)和纯度大于 96% 的氢氧化钠(NaOH,生工生物工程股份有限公司)调节水体 pH。

1.2 方法

用梳子轻柔地剥取处于 7 对附肢期(橘黄色)的胚胎,经过 3 000 mg/L 甲醛浸泡消毒 15 min,随后置于 ZISS 孵化器中进行离体孵化(图

1),并且在虾卵阶段每隔一日进行 3 000 mg/L 甲醛浸泡消毒 15 min,虾卵孵出后不进行消毒处理。

试验设置 5 个 pH 试验组:6.8、7.7、8.4、8.9 和 9.4,通过定期检测与调节保持 pH 的稳定,水温为 $(28\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$,溶氧 5 mg/L 以上。每个试验组 3 个平行,各放 200 粒胚胎,每隔 1 d 统计所有试验组中死胚、死虾、孵化时间、出苗时间(发育至可自由运动的 3 期幼虾的时间)、出苗量(可自由运动的 3 期幼虾数量)等数据。

$$H = (J_1/E) \times 100\% \quad (1)$$

$$S = (J_3/E) \times 100\% \quad (2)$$

式中: H 为孵化率(Hatching rate); S 为出苗率(Survival rate); J_1 为初孵幼虾(Juveniles stage 1)数量; J_3 为可自由运动的 3 期幼虾(Juveniles stage 3)数量, E 表示试验初胚胎数量。

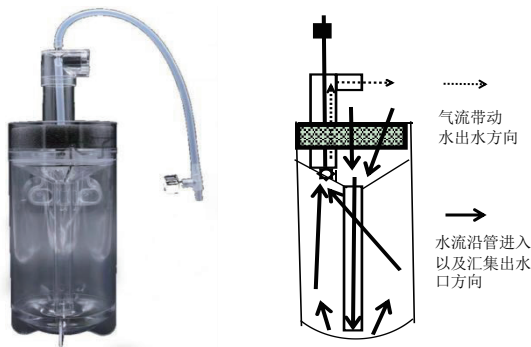


图 1 ZISS 孵化器及其原理图

Fig. 1 ZISS Incubator and its schematic diagram

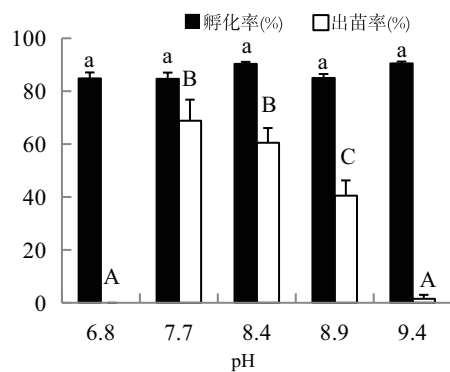
1.3 数据处理

所有数据均用平均值 $\pm$ 标准差表示,应用 SPSS 17.0 进行单因素方差分析,Duncan's 多重比较分析各组间的差异显著性($P<0.05$)。

2 结果

2.1 不同 pH 组的孵化率与出苗率

图 2 表明,各组孵化率均在 84.0%以上,且各 pH 组间无显著性差异($P>0.05$),但 pH 8.4 组的孵化率略高于其他四组。pH 对出苗率影响较大,pH 较高或较低均影响出苗率,pH 7.7 组和 pH 8.4 组显著高于其他三组($P<0.05$),pH 为 6.8 时出苗率为 0%,与 pH 9.4 组无显著性差异($P>0.05$),均显著低于其他三组($P<0.05$);在 pH 7.7~9.4 之间出苗率呈下降趋势。



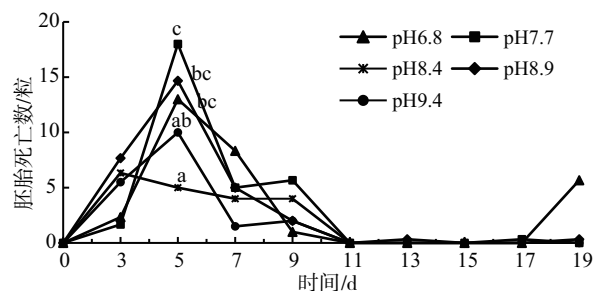
注:上标相同字母表示差异不显著($P>0.05$),不同字母则差异显著($P<0.05$)。下同

图 2 红螯螯虾离体胚胎孵化率、出苗率与水体 pH 的关系

Fig. 2 The relationship between pH value and hatching rates, and survival rates

2.2 不同 pH 对胚胎孵化的影响

图 3 显示,不同 pH 对胚胎孵化的影响主要有 3 个方面:1)未发现孵化期间 pH 的变化导致胚胎大量死亡现象,所有试验组孵化率均在 84.0%以上;2)各 pH 组胚胎死亡高峰集中在第 5 天,其中 pH 8.4 组在第 5 天的胚胎死亡数最低,显著低于 pH 7.7、8.9 与 6.8 三组($P<0.05$);pH 7.7 组的胚胎死亡数最高,显著高于 pH 8.4 组和 pH 9.4 组($P<0.05$),第 5 天后死亡数目逐渐下降,但 pH 6.8 组在第 19 天仍有胚胎死亡个数升高的现象(图 3);3) pH 6.8 组胚胎孵化时间较长,其他组均于第 11~13 天后孵出,该组至第 19 天后仍有部分活胚胎未孵出。



注:同一日平均值上标相同字母表示平均值间差异不显著($P>0.05$),同一日平均值上标不同字母则差异显著($P<0.05$)。下同

图 3 不同 pH 条件下胚胎死亡数目随时间的变化

Fig. 3 Changes in the number of dead embryos under different pH conditions with time

2.3 不同 pH 对初孵幼虾出苗的影响

结果显示,不同 pH 对初孵幼虾出苗的影响主要有 3 个方面。1) 孵出后 pH 的变化会导致幼虾大量死亡,其中 pH 6.8 组和 pH 9.4 组的出苗率分别仅为 0% 和 1.5%。2) pH 9.4 组于第 11 天最先开始出现幼虾大量死亡现象,随后 pH 6.8 组于第 17 天开始出现该现象,其他 3 组未出现某个时间点幼虾大量死亡的现象,即高 pH 组幼虾最先大量死亡,随后是低 pH 组,中间 3 组则未出现幼虾大量死亡(图 4)。3) 最高和最低 pH 组幼虾基本未出苗,其他 3 组出苗集中在第 19 天和第 25 天,以第 19 天为主。在第 19 天,pH 7.7 和 pH 8.4 组的出苗量无显著性差异($P>0.05$),且均显著高于其他各组($P<0.05$);在第 25 天,pH 7.7 组的出苗量显著高于其他各组($P<0.05$)(图 5)。

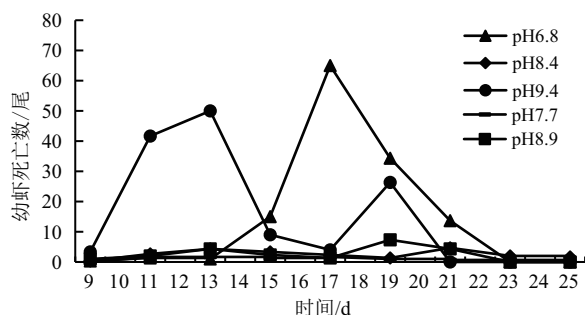


图 4 不同 pH 条件下初孵幼虾死亡数目随时间的变化

Fig. 4 Changes in the number of dead juveniles under different pH conditions with time

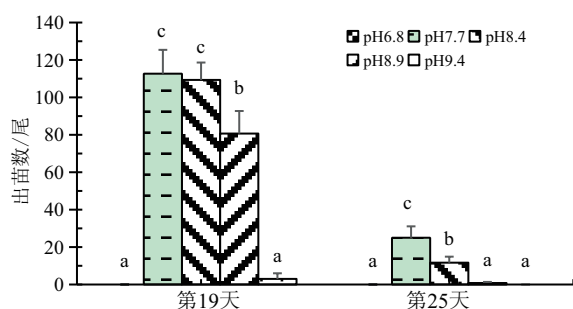


图 5 不同 pH 条件下初孵幼虾出苗数随时间的变化

Fig. 5 Changes in the number of newly hatched juveniles under different pH conditions with time

2.4 出苗率与水体 pH 的回归方程与极值分析

出苗率与水体 pH 的二次回归方程为: $y = -$

$40.465x^2 + 654.572x - 2578.188$ ($R^2 = 0.964$), 结果可知,判定系数 $R^2 = 0.964$,显著性水平为 0.000,说明二项式回归方程的回归效果非常显著,即 pH 与出苗率的检出系数拟合程度很好(图 6)。

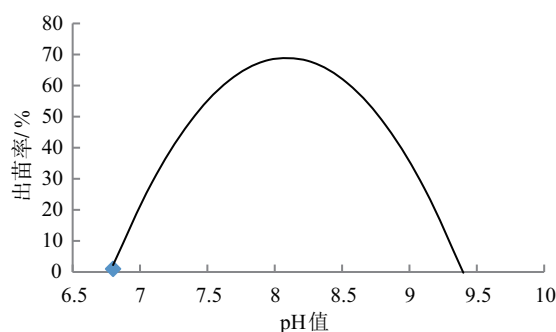


图 6 出苗率与水体 pH 的二次回归方程

Fig. 6 Quadratic regression equation between survival rate and pH value

根据二项式回归方程求极值点的公式, $x = 8.088$ 时, y 得到最大值 68.942 3,因此,根据该回归方程,当 pH 为 8.1 时,红螯螯虾离体胚胎出苗率达到最高的 68.94%。

3 讨论

3.1 pH 对离体胚胎孵化的影响

雷慧僧^[13]曾报道,过低的 pH 使鱼类胚胎膜软化,失去弹性,胚胎易破膜死亡;pH 过高,卵膜也会提前溶解而使胚胎死亡。丁宏印等^[25]研究发现,水的 pH 影响锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 胚胎发育,水体适宜 pH 为 7.0~9.0,最适 pH 为 7.8~8.2,且胚胎大部分在复眼色素形成期死亡发生。Magallon 等^[26]研究表明,pH 为 9 时,凡纳滨对虾的孵化率较低。本研究中,所有试验组离体胚胎孵化率均在 84.0% 以上,且各 pH 组的孵化率无显著性差异,说明孵化率受 pH 影响较小,推测可能是因为红螯螯虾胚胎卵膜较厚,胚胎在卵膜的保护下,对水中 pH 的变化不敏感。各试验组胚胎死亡高峰期主要发生在孵化第 5 天,这可能与胚胎至第 5 天时基本发育至复眼色素形成期有关,该时期的胚胎开始主动吸收离子,对外界环境变化较为敏感^[27-28]。鉴于第 5 天 pH 8.4 组的胚胎死亡数最低,显著低于 pH 7.7、8.9 和 6.8 三组 ($P<0.05$),可能是因为当胚胎发育至复眼色素形成期后继续发育需要新物质和能量,而新物质的

产生和能量的释放都需要在酶在活力较高时才能有效完成,因此,综合推测 pH 为 8.4 更有利于离体胚胎内酶活性的提高。这与丁宏印等^[25]结果相一致。他们也推测胚胎的阶段死亡与其发育至复眼色素形成期。该期对外界环境较为敏感,需要适宜的环境以提高酶活性^[25]。本研究还发现,在低 pH 条件下,离体胚胎孵化时间较长,胚胎孵化受到明显抑制。苑彦中^[12]的研究也认为,红螯螯虾孵化期间 pH 不宜在 7.0 以下,否则可能造成孵化困难或者孵化期延长。丁宏印等^[25]的研究表明,孵化水体 $\text{pH} \leq 6.8$ 时会明显降低胚胎发育速度,并认为在 pH 过低时,卵膜结构和酶活性会发生改变,使得其渗透压平衡与新陈代谢水平失调,造成其某一结构破坏或失去功能,影响其孵化。因此,可以推测,pH 6.8 组胚胎孵出延缓是因为低 pH 影响胚胎内与孵化相关的某些功能的表达,具体原因需要深入探索。

3.2 pH 对孵出后幼虾出苗的影响

水体环境中 pH 的高低影响着虾类的生长生存。早期认为,动物体内的 pH 接近中性,当外界环境中 pH 过高或过低超出其体内化学反应系统的缓冲能力时,动物机体无法维持体内正常的 pH 便出现代谢紊乱,严重时可致死^[29]。现有研究认为,不同虾类所耐受的和适宜生长的 pH 范围不同,过高或过低的 pH 值均会不同程度造成虾蜕壳困难或者代谢紊乱,最终死亡^[30-31]。不同种类的幼虾耐受 pH 的范围相差较大。Allan 等^[32]曾报道,pH 为 6.1~7.8 范围内,斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 孵出后幼体一般较少死亡,但当 pH 小于 5.1 时则会出现大量幼体死亡现象。日本囊对虾 (*Penaeus japonicus*) 幼虾的最适 pH 为 8.0~8.2,适应范围为 7.7~8.6^[33]。杨富亿等^[34]研究表明,随着 pH 的升高,日本沼虾幼虾死亡率先下降后上升,表明 pH 对幼虾的急性毒性呈双向剂量效应。Wang 等^[35]报道,中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 在 $\text{pH} \geq 8.5$ 或 $\text{pH} \leq 6.0$ 时,幼体存活率均较低。本研究表明,出苗率受 pH 影响较大,pH 6.8 和 9.4 组出苗率仅为 0% 和 1.5%,pH 7.7 组的出苗率则高达 68.86%。李进^[36]研究了抱卵红螯螯虾的 pH 适宜范围。结果表明,在 pH 6.0~6.5、6.5~7.0 和 8.5~9.0 范围内,出苗率分别为 53.13%、67.46% 和 65.76%;

当 pH 由中间向低或高调节的过程中,出苗率均有下降趋势,这与本试验结果类似;但是偏酸性或偏碱性的水体中仍有较高的出苗率,与本试验结果不同。本试验中,pH 为 6.8 时,出苗率为 0%,部分胚胎在孵化器内的时间超过了 19 天,且最终没有孵出;pH 9.4 时,出苗率仅为 1.5%,呈现急剧下降趋势。其试验结果表明,红螯螯虾出苗率最高的 pH 范围为 7.5~8.0^[36],与本试验推测结果(pH 为 8.1 出苗率最高)略有差别。本研究中,pH 为 9.4 时孵化后的幼虾死亡峰值比 pH 为 6.8 时提前 4 天。试验发现,ZISS 孵化罐以及试验用箱体表面有粗糙颗粒物,结合么宗利等^[17]的研究推测,高 pH 条件下产生的粗糙颗粒物极有可能为碳酸钙沉积,碳酸钙沉积意味着水体中的钙离子含量下降。Dall 等^[37-38]认为,对虾在蜕壳前会从水体中大量吸收钙离子,以满足早期钙化需求,且认为在凡纳滨对虾在钙含量较低的水体中抗病力较差。因此,钙离子含量降低会导致对虾蜕壳困难,影响对虾成活率。刘栋梁^[39]同样认为,pH 为 9.23 时,明显抑制了克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 蜕壳,死亡率升高。高 pH 条件下,水体中 CO_3^{2-} 比例上升, CO_3^{2-} 是主要的毒害因子^[17-18],故高 pH 组红螯螯虾孵化后最先出现死亡高峰期的原因极有可能为钙离子含量较低以及 CO_3^{2-} 含量上升综合影响幼虾的正常生长、蜕壳并导致其大量死亡。而低 pH 条件下, H^+ 含量增加,会导致养殖期间鱼虾酸中毒,表现为生理性缺氧,即导致虾类体内部分酶的功能及血蓝蛋白运输氧的功能减弱,氧能力下降^[16]。本试验中,最低 pH 组的 pH 为 6.8,表现为慢性中毒,高 pH 与低 pH 中毒机理不同,故此低 pH 组在试验后期出现死亡高峰期。除此之外,低 pH 导致胚胎孵化滞后,也可能是死亡高峰期滞后的原因。

3.3 基于该离体孵化系统的 pH 工程化控制

Perez 等^[40]于 20 世纪提出孵化系统对淡水螯虾类胚胎离体孵化的成功有重要影响。Joly 等^[41]研究认为,红螯螯虾养殖技术已较成熟,下一步的关键应该是开发适宜的孵化系统。结合当前渔业智能化、数字化、工程化的大趋势,认为红螯螯虾离体孵化的研究方向是适宜的离体孵化系统的开发及智能化、数字化、工程化的配套。今后的研究可以基于该离体孵化系统,通过物联网技

术将水质传感器、增氧设备、控温装置、水循环等设备集成,实现对当下离体孵化生态数据的实时采集,辅助管理人员对当下孵化情况的实时掌握,提高孵化效率,保证生产安全。通过对包括 pH 在内的整个孵化环境的具体指标进行实时监控,并对水质指标阈值进行设置,对突发事件及时响应,实现工程化控制,如根据 pH 等探头的数据反馈,对孵化用水的排出与清洁水的汇入等进行自动化调节,保证水质的稳定等。因此,本次研究的结果可以为今后 pH 工程化控制与智能化离体孵化提供数据支持。

4 结论

在 pH 为 6.8~9.4 范围内,红螯螯虾离体胚胎孵化率不受 pH 影响,但 pH 为 6.8 时会造成胚胎孵化时间延长,且会造成孵化后的幼虾无法存活,与亲虾在此 pH 条件下抱卵孵化出苗率有较大差异,亲虾在此条件下仍有 65% 以上出苗率,分析认为,红螯螯虾离体胚胎以及幼虾在长期 pH 过低的试验条件下,存在酸中毒的现象,造成胚胎以及幼虾生理性缺氧,另外,低 pH 可能造成了卵膜结构改变以及影响胚胎酶的活性,导致胚胎无法正常发育,最终死亡;pH 为 9.4 时会造成孵出后的幼虾生长发育困难,短时间内相对其他试验组首先出现大量死亡,高 pH 试验条件下,钙离子含量降低以及 CO_3^{2-} 中毒可能是造成幼虾最先出现大量死亡的原因;应用 ZISS 孵化器筛选出了红螯螯虾离体孵化最优 pH 条件,根据线性方程结果推测红螯螯虾离体胚胎孵化最适的 pH 为 8.1,对孵化过程中的最适 pH 范围进行了精确化,有助于提高孵化率和出苗率,对于实际生产有指导作用,为红螯螯虾大规模孵化离体胚胎及今后 pH 工程化控制与智能化离体胚胎孵化提供了基础水质数据。

□

参考文献

- [1] CHENG S, JIA Y Y, CHI M L, et al. Culture model of *Cherax quadricarinatus*: temporary shelter in shed and pond culture[J]. Aquaculture, 2020, 526: 1–8.
- [2] 王庆. 克氏原螯虾繁育机制及养殖生态学研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2012.
- [3] KING C R. Egg development time and storage for red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* von Martens[J]. Aquaculture, 1993, 109: 275–280.
- [4] CACECI T, CARLSON C B, TOTH T E, et al. In vitro embryogenesis of *Macrobrachium rosenbergii* larvae following in vivo fertilisation[J]. Aquaculture 1996, 147: 169–175.
- [5] CARRAL J M, CELADA J D, GONZALEZ J, et al. Artificial incubation of crayfish eggs (*Pacifastacus leniusculus* Dana) from early stages of embryonic development[J]. Aquaculture 1992, 104, 261–269.
- [6] CHENG S, JIA Y Y, CHI M L, et al. The exploration of artificial incubation of *Cherax quadricarinatus* eggs [J]. Aquaculture, 2020, 529: 1–6.
- [7] ROYUELA M S, MELENDRE P M, CELADA J D, et al. Possibilities of artificial incubation of signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana) eggs at high densities and reduced flow rate using formaldehyde as antifungal treatment [J]. Aquaculture, 2009(288): 65–68.
- [8] RUDGE E, O' SULLIVAN D. Egg incubator shows promise for redclaw[J]. Austasia Aquaculture, 2007, 6: 27–37.
- [9] ROYUELA M S, MELENDRE P M, CELADA J D, et al. Possibilities of artificial incubation of signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana) eggs at high densities and reduced flow rate using formaldehyde as antifungal treatment [J]. Aquaculture, 2009(288): 65–68.
- [10] CLIVE M J, COLIN V. Development of Mass Production Hatchery Technology for the Redclaw Crayfish, *Cherax quadricarinatus* [J]. Freshwater Crayfish, 2020, 25(1): 1–6.
- [11] JONES C, VALVERDE C. Development of mass production hatchery technology for the redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* [J]. Freshwater Crayfish, 2020, 25(1): 1–6.
- [12] 苑彦中. 澳洲淡水龙虾的生物学特性及人工繁殖技术总结 [J]. 河南水产, 2017(4): 6–8.
- [13] 雷慧僧. 池塘养鱼学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982: 139–141.
- [14] 覃玉莲, 韩庆, 黄强, 等. 低 pH 值胁迫对小龙虾免疫功能及死亡率的影响[J]. 现代农业科技, 2020(23): 198–205.
- [15] 李玉全. pH 胁迫对脊尾白虾代谢酶活力的影响[J]. 南方农业学报, 2014, 45(06): 1098–1101.
- [16] 刘志华, 王铁军. pH 值对水产养殖的影响[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2012(12): 99–99.
- [17] 么宗利, 王慧, 周凯, 等. 碳酸盐碱度和 pH 值对凡纳滨对虾仔虾存活率的影响[J]. 生态学杂志, 2010, 29(5): 945–950.
- [18] 王丽. 海水鱼类养殖系统二氧化碳体系毒性作用研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004.
- [19] 苑彦中. 澳洲淡水龙虾的生物学特性及人工繁殖技术总结 [J]. 河南水产, 2017(4): 6–8.
- [20] 陶易凡, 强俊, 王辉, 等. 高 pH 胁迫对克氏原螯虾的急性毒性和鳃、肝胰腺中酶活性及组织结构的影响[J]. 水产学报, 2016, 40(11): 1694–1704.
- [21] 刘宝正, 解桂莲. pH 值对河蟹溞状幼体变态的影响及调节方

- 法之二[J]. 中国水产, 2001(2): 1.
- [22] 郭成秀, 张士华, 刘志国. 黄河三角洲地区刺参养殖池塘 pH 值的作用及调节措施[J]. 齐鲁渔业, 2010, 27(01): 23.
- [23] 朱明瑞, 曹广斌, 蒋树义, 韩世成. 工厂化水产养殖水体的 pH 值在线自动控制系统[J]. 水产学报, 2007(03): 335-342.
- [24] 王充. 三种化合物对海水 pH 值、碱度和硬度的调节效果比较[J]. 江西水产科技, 2020(05): 11-14.
- [25] 丁宏印, 姚海富, 李贵玲, 等. 孵化水体 pH 值对锯缘青蟹胚胎发育的影响[J]. 水产养殖, 2010, 31(9): 8-11.
- [26] MAGALLON B J, SERVIN V R, PORTILLO C G, et al. *Litopenaeus vannamei* (Boone) post-larval survival related to age, temperature, pH and ammonium concentration [J]. Aquaculture research, 2010, 37(5): 492-499.
- [27] LLOYD R, JORDAN D H. Some factors affecting the resistance of rainbow trout (*Salmo gairdnerii* Richardson) to acid waters [J]. Air Water Pollut, 1964, 8: 393-403.
- [28] JENSEN KW, SNEKVIK E. Low pH levels wipe out salmon and trout population in southernmost Norway [J]. Ambio, 1972, 1: 223-225.
- [29] DENNIS WW. 动物生理学原理[M]. 李永材译. 北京: 人民教育出版社, 1981: 80-95.
- [30] 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[J]. 淡水渔业, 2016, 46(4): 96-100.
- [31] 林小涛, 张秋明. 虾蟹类呼吸代谢研究进展[J]. 水产学报, 2000, 24(6): 575-580.
- [32] ALLAN G L, MAGUIRE G B. Effects of pH and salinity on survival, growth and osmoregulation in (*Penaeus monodon*) Fabricius [J]. Aquaculture, 1992, 107: 33-47.
- [33] 水柏年. 日本对虾虾苗对若干环境因子的适应性研究[J]. 水产学报, 2004, 28(4): 468-472.
- [34] 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, 6: 74-79.
- [35] WANG W N, WANG A L, CHEN L, et al. Effects of pH on survival, phosphorus content ration, adenylate energy charge and $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activities of *Penaeus chinensis* Osbeck juveniles [J]. Aquatic Toxicology, 2002, 60: 75-83.
- [36] 李进. 水环境理化因子对红螯螯虾繁殖性能和幼体发育的影响研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.
- [37] DALL W, HILL B J, ROTHLSBERG PC, et al. 对虾生物学[M]. 陈楠生等译. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1992: 114-123.
- [38] 周凯, 来琦芳, 王慧, 等. Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对凡纳滨对虾仔虾生存的影响[J]. 海洋科学, 2007, 31(7): 4-7.
- [39] 刘栋梁, 黄建华, 杨丽诗, 等. 多种环境因子对克氏原螯虾蜕壳死亡的影响及对策研究[J]. 南方水产科学, 2020, 16(2): 29-35.
- [40] PEREZ J R, CARRAL J M, CELADA J D, et al. Effects of stripping time on the success of the artificial incubation of white-clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet), eggs [J]. Aquaculture Research, 1998, 29(6): 389-395.
- [41] JOLY G, PATRICK S. Molting, reproductive biology, and hatchery management of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens 1868) [J]. Aquaculture, 2012, 358-359(15): 183-195.

Effects of different pH values on in vitro artificial incubation of embryos of red claw crayfish *Cherax quadricarirus*

WEI Yongchun^{1,2,3}, CHENG Shun², JIA Yonyi², CHI Meili², LIU Shili²,
ZHENG Jianbo², LI Fei², LIU Yinuo², GU Zhimin^{1,2,3}

(1 Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources,
Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2 Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/ Key Laboratory of Freshwater Aquatic Animal Genetic and Breeding of Zhejiang Province, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, Zhejiang China; 3 National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: To improve the hatching effect of red claw crayfish embryos in vitro and provide basic water quality data for large-scale incubation, in this study, the ZISS incubator was used to explore the effect of pH on the in vitro incubation performances of red claw crayfish embryos, such as hatch time (to freely moving juveniles stage 3), hatching amount (the number of juvenile shrimps reaching stage 3), hatching rate and survival rate etc., in the wish to find out the optimal pH level. At water temperature of $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 7 pairs of appendage embryos were stripped with a comb, soaked in 3 000 mg/L formaldehyde for 15 min, then incubated in a ZISS incubator respectively at pH of 6.8, 7.7, 8.4, 8.9 and 9.4 adjusted by 30% ~ 40% HCl and NaOH, for a 25-day experiment. The results showed that there was no significant difference in hatching rate among all the groups ($P > 0.05$). However, the red claw crayfish exposed to pH 7.7 and pH 8.4 had significantly higher survival rates than those in the other three groups ($P < 0.05$), with 0% survival rate in pH 6.8 group, and without significant difference from that in pH 9.4 group ($P > 0.05$). There was significantly lower survival rate in the two groups than that in the other three groups ($P < 0.05$), with downward trend of survival rates between pH 7.7 and 9.4 groups. Changes in pH value during incubation did not lead to a large number of embryo death, with the death peak of embryo in all pH groups on the 5th day, and the longer incubation period of the embryos in pH 6.8 group. In the pH 7.7 and 9.4 groups, a large number of death juveniles were found, while not found in the three middle pH value groups. Red claw crayfish juveniles were observed in 19d and 25d. The results showed that the hatching rate of in vitro embryos of red crayfish was not affected by pH changes within a pH range of 6.8~9.4. However, low pH will prolong the incubation time of embryos and make the young shrimps unable to survive after hatching, leading to the phenomenon of acidosis and resulting in physiological hypoxia and final death of embryos and young crayfish. While when pH is too high, the decrease of calcium ion content and CO_3^{2-} poisoning may be the reasons for the first mass death of young shrimps. According to the experiment, the optimal pH for in vitro embryo hatching of red crayfish is 8.1. This result provides a concrete optimal pH value for the hatching processes, which will be helpful to improve the hatching rate and survival rate, and play a guiding role in future practical production.

Key words: *Cherax quadricarirus*; embryo; pH; artificial incubation; incubator; aquaculture