

低温下大菱鲆有水和无水保活过程中 生理生化变化的研究

刘伟东^{1,2} 薛长湖¹ 殷邦忠² 刘 淇^{2*}

(¹中国海洋大学, 青岛 266003)

(²中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘要 研究了3±0.1℃保活条件下大菱鲆有水和无水状态下的成活率和生理生化指标的变化。结果表明,(1)大菱鲆有水保活72h成活率达到100%,无水保活60h成活率为95%。(2)保活过程中大菱鲆肌肉中的ATP含量明显下降,而且无水保活的大菱鲆肌肉中ATP含量低于有水保活的。(3)保活过程中,大菱鲆血液指标MCV、BUN、CR和UA有随保活时间增加而升高的趋势,血液指标GLU、CHE有随时间增加而下降的趋势。有水保活的大菱鲆血液中BUN、CR、UA和GLU显著高于无水保活。通过对大菱鲆血液的生理生化指标分析,保活过程中大菱鲆死亡的原因之一是代谢产物不能有效排出,体内氨氮类有害物质含量过高。

关键词 大菱鲆 低温保活 生理生化

中图分类号 S981 **文献识别码** A **文章编号** 1000-7075(2009)05-0069-06

Physiological and biochemical change of *Scophthalmus maximus* kept alive at low temperature with or without water

LIU Wei-dong^{1,2} XUE Chang-hu¹ YIN Bang-zhong² LIU Qi^{2*}

(¹Ocean University of China, Qingdao 266003)

(²Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT In this experiment, the survival rate and change of physiological and biochemical indices of turbot *Scophthalmus maximus* which were kept alive at 3±0.1℃ were examined. The results showed that: (1) The survival rate after 60h was 95% without water. (2) The ATP contents of the muscle decrease obviously, and it was lower for fish kept in water than fish kept without water. (3) During the experiment, the MCV, BUN, CR and UA of the fish blood showed a trend of increase; however, the CR, UA and GLU for fish kept in water were obviously lower than those kept without water. The physiological and biochemical analysis revealed that, one of the reasons for fish mortality may be the inhibited excretion of metabolites, resulting in excessively high content of ammonia nitrogen which was harmful to the fish.

KEY WORDS *Scophthalmus maximus* Keeping alive at low temperature
Physiological and biochemical

公益性行业(农业)科研专项(nhyzx07-046)资助

*通讯作者。E-mail: liuqi@ysfri.ac.cn Tel: (0532)85830760

收稿日期:2009-03-25;接受日期:2009-04-13

作者简介:刘伟东(1982-),男,硕士研究生,主要从事水产品保鲜保活研究, E-mail:lwdww2008@yahoo.com.cn

大菱鲆 *Scophthalmus maximus* 属于硬骨鱼纲、鲽形目、鲽亚目、鲆科、菱鲆属，原产于欧洲，是名贵的低温经济鱼类；以肉质鲜嫩、胶质丰富和口感独特而深受消费者喜爱。1992 年由黄海水产研究所雷霁霖院士（1999、2002、2003、2005）引入中国，在突破苗种繁育和养殖模式等关键技术后，成为我国北方沿海地区主要的海水鱼类养殖品种，年产量突破 50 000 t。

随着人民生活水平的提高，对水产品的鲜活度要求也越来越高，鲜活水产品的市场不断扩大。众多科研单位和企业进行了活鱼运输技术的研究开发。刘淇等（1999）报道，低温法无水保活牙鲆，50 h 成活率 100%；田朝阳等（2000）长距离运输石斑鱼 48 h，成活率达 100%；田标等（2004）低温无水保活黑鲷 6 h 获得成功；张恒等（2008）采用碳酸休眠法无水保活鲫鱼 15 h。

我国大菱鲆主要养殖区域在山东和辽宁等北方沿海地区，而消费区域遍布全国，几乎全部以活鱼的方式销售，其中广东省是最大的消费市场，其消费量占全国的 50% 左右。因此研究大菱鲆保活状态下的生理生化变化，对提高其保活技术具有指导意义。本文对低温保活过程中大菱鲆肌肉和血液的生理生化指标变化进行了分析与探索，以期为大菱鲆活体保活运输实践提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

大菱鲆（10 月龄、体重 420±30g），购于青岛通用水产养殖有限公司，暂养于黄海水产研究所试验室；养殖用水为砂滤海水，水温 6±1℃，盐度 31，pH8.0；暂养期间连续充气，不投饵，暂养 48 h 后用于实验。本实验中，有水和无水保活各用 35 尾，总计共用大菱鲆 70 尾。

SPX-250B5-II 生化培养箱，METTLER AE240 电子天平，Heidolph DIA×900 匀浆机，Centrifuge 5804r 台式高速冷冻离心机，Agilent 1100 高效液相色谱仪，日本东亚 SYSMEX F-820 型多参数血液细胞分析仪，日立 7170S 全自动血液生化分析仪。

1.2 保活方法

1.2.1 有水保活

按鱼水比 1:1 加入海水（6±1℃），使海水能覆盖整个鱼体。排出双层充气袋内空气后，充入纯氧，氧气约占双层袋内总体积的 3/4，用橡皮筋将袋口扎紧，做标签记录后，移入生化培养箱内（预先调温度至 3℃）。

1.2.2 无水保活

放入无水双层充气袋内的大菱鲆，排出袋内空气后，充入与有水保活条件下的同体积纯氧，用橡皮筋将袋口扎紧，做标签记录后，移入生化培养箱内（预先调温度至 3℃）。

1.2.3 观察与记录

间隔 6 h 观察大菱鲆的生存状况。保活过程中，目测大菱鲆的呼吸频率和体表状况，确定大菱鲆的生存状况。长时间的低温保活过程中，特别是无水状态，大菱鲆的呼吸频率明显下降，鳃盖扇动幅度也变小，注意大菱鲆有眼侧体表颜色的变化，背鳍、腹鳍、边鳍和尾鳍收敛度。当鱼鳍收敛于躯干，反复刺激鱼无反应则视为死亡。

1.2.4 取样

移入生化培养箱后，在保活 24、36、48、60 和 72 h 时，分别取 5 尾有水保活的大菱鲆和 5 尾无水保活的活大菱鲆。肌肉样品采集：从大菱鲆有眼侧背部，靠近脊柱处取 2 g 肌肉（去除表皮）；血样采集：使用注射器（2 ml）从大菱鲆尾静脉一次性抽取 2 ml 血液，去针头后注入加有抗凝剂（EDTA）的血常规专用试管（3 ml）。

1.2.5 样品处理与检测

肌肉样品切碎后，加 10% 高氯酸匀浆，低温 5 000 r/min 离心 10 min 后取上清液，沉淀加 5% 的高氯酸匀浆后，低温 5 000 r/min 离心 5 min 后取上清液，合并两次上清液，用 1 mol/L 的 KOH 中和至中性，静置沉淀后取上清液，定容到 50 ml，滤膜过滤后取 2 ml，-40℃ 储存备用。检测时，流动相为柠檬酸 40 mmol，醋酸 20 mmol，

三乙胺 20mmol 的混合溶液,流速 1ml/min,紫外检测器波长 254 nm。

血样暂放冰盒内,1h 内到青岛阜外心血管医院血检中心,采用东亚 SYSMEX F-820 型多参数血液细胞分析仪检测大菱鲆的血液常规指标,采用日立 7170S 全自动血液生化分析仪检测大菱鲆血液的生化指标。

1.2.6 数据分析

试验数据使用平均值±标准差(Mean±SD),SPSS11.5 版系统分析软件进行比较和差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 大菱鲆低温保活过程中的存活率

大菱鲆在 3℃ 下保活至 60 h 时无水保活组死亡 1 尾,有水保活组至 72 h 全部成活,3℃ 保活过程中大菱鲆存活率见图 1,其无水保活存活率与刘淇(1999)报道的牙鲆无水保活存活率有一致性。实验表明,3℃ 时,大菱鲆无水状态保活 48 h 存活率 100%,60 h 时存活率达 95%,这表明低温无水保活大菱鲆具有广阔的发展空间,在实际运输中有很高的应用价值。此外,考虑到实验前大菱鲆暂养在 6℃ 海水中,与生化培养箱内的温度有 3℃ 的温差,这很可能影响到无水保活时大菱鲆的存活率,使本实验的存活率有所下降。

2.2 大菱鲆低温保活过程中的生理状况

实验中,大菱鲆暂养时的呼吸频率为 25~30 次/min。保活过程,试验前 24 h 中,大菱鲆的呼吸频率迅速降低,然后呼吸频率随时间降低趋势变缓慢,并且保活中鳃的扇动幅度也随保活时间逐渐减弱。相同时间,无水状态下的大菱鲆变化趋势更加明显,结果见表 1。

表 1 3℃ 条件下有水和无水保活对大菱鲆的生理影响

Table 1 The physiological effects on turbots kept alive with or without water at 3℃

保活状态 Condition	时间 Time	呼吸频率 Breath frequency (次/min)	呼吸幅度 Breath amplitude	眼侧体色 Body color of eye side	收敛度* Convergence degree
有水 With water	12	17~23	正常 Normal	正常 Normal	正常 Normal
	24	16~20	正常 Normal	正常 Normal	正常 Normal
	36	14~18	正常 Normal	正常 Normal	正常 Normal
	48	12~15	略减少 Appreciably diminution	正常 Normal	正常 Normal
	60	12~14	略减少 Appreciably diminution	正常 Normal	正常 Normal
	72	9~12	略减少 Appreciably diminution	正常 Normal	正常 Normal
	12	15~21	正常 Normal	正常 Normal	正常 Normal
无水 Without water	24	12~16	正常 Normal	局部略变深 Darker partly	正常 Normal
	36	9~13	略减少 Appreciably diminution	局部略变深 Darker partly	正常 Normal
	48	9~11	减少 Diminution	整体变深 Darker totally	略收敛 Appreciably furl
	60	8~10	微弱 Weak	整体变深 Darker totally	收敛 Furl
	72	7~9	微弱 Weak	整体变深 Darker totally	收敛 Furl

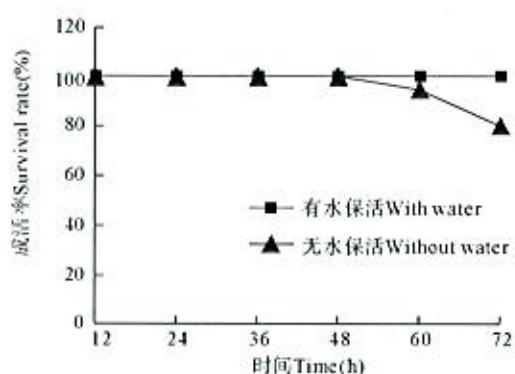


图 1 3℃ 条件下大菱鲆保活过程中存活率曲线

Fig. 1 The survival rate of turbots kept alive at 3℃

注: * 收敛度指鱼在异常情况下边角向躯干的靠拢程度,当收敛度大于 10 度时,视为略收敛,当收敛度大于 20 度时,视为收敛。

取样时大菱鲆的鱼体有僵硬感,鱼的活跃度也有明显下降。抽血过程中,发现血液较正常状态黏稠,流动

性也不如正常状态好,特别是无水保活状态的大菱鲆这种现象更为明显。这种现象是因为鱼是冷血动物,低温会使鱼体温度降低,从而影响鱼肌肉的活动,血液流动性降低。实验表明,抽血后的大菱鲆放回清新海水中,一段时间后仍能恢复活力。

2.3 大菱鲆低温保活过程肌肉中 ATP 的变化

分别以 0.5、1.0、2.5 和 10.0 $\mu\text{mol/g}$ 浓度的标准 ATP 的溶液进行色谱分析。以浓度(X)对峰面积(Y)做工作曲线。ATP 回归方程:

$$Y = 779.96X, R^2 = 0.9999$$

将大菱鲆肌肉样品检测到的峰面积代入回归方程,得到大菱鲆低温保活过程中肌肉的 ATP 含量,结果见表 2。

表 2 3℃保活大菱鲆肌肉中 ATP 含量变化
Table 2 The ATP contents of muscle of turbots kept alive at 3°C

组别 Group	0h	24h	36h	48h	60h	72h
有水保活 With water ($\mu\text{mol/g}$)		3.66	3.37	2.89	2.61	2.15
无水保活 Without water ($\mu\text{mol/g}$)	3.92	3.59	3.26	2.61	1.99	1.35

表 2 表明,大菱鲆在低温保活过程中,肌肉中的 ATP 被大量消耗,并且未能得到有效地补充。相同的保活时间里,有水保活大菱鲆肌肉中的 ATP 含量比无水状态中的 ATP 含量高。

2.4 大菱鲆低温保活过程血液生理指标变化

由表 3 可以得出,大菱鲆在 3℃ 分别进行有水和无水保活,其血液中的红细胞总数 RBC、血红蛋白 HGB、平均胞血红蛋白量 MCH、红细胞压积 HCT,在 24、36、48、60 和 72h 相对应的差异不显著($P > 0.05$);其血液的平均红细胞体积 MCV 有随着保活时间增长逐渐增大的趋势。大菱鲆血液的 MCV 增大明显,有水保活和无水保活 72h 时 MCV 分别比 24h 时增加 23.65% 和 13.56%。

2.5 大菱鲆低温保活过程血液生化指标变化

由表 4 可以得出,在 3℃ 保活条件下,大菱鲆血液中的尿素氮浓度 BUN 和肌酐浓度 CR 和尿酸浓度 UA

表 3 3℃保活大菱鲆的血液生理指标的变化
Table 3 Blood physiological indices of turbots kept alive at 3°C

项目 Item	组别 Group	24h	36h	48h	60h	72h
RBC ($10^{12}/\text{L}$)	有水 With water	1.23 \pm 0.11*	1.15 \pm 0.35*	1.15 \pm 0.26*	1.25 \pm 0.23*	1.35 \pm 0.20*
	无水 Without water	1.27 \pm 0.18*	1.25 \pm 0.07*	1.15 \pm 0.06*	1.16 \pm 0.14*	1.19 \pm 0.21*
HGB (g/L)	有水 With water	27.2 \pm 3.03*	28.8 \pm 5.10*	30.8 \pm 3.90*	34.10 \pm 5.29*	36.20 \pm 3.10*
	无水 Without water	31.20 \pm 4.55*	29.00 \pm 4.36*	32.33 \pm 2.52*	31.33 \pm 2.34*	32.33 \pm 4.04*
MCV (fL)	有水 With water	137.60 \pm 11.16*	145.18 \pm 13.05*	152.13 \pm 13.60*	168.30 \pm 3.94*	170.15 \pm 7.68*
	无水 Without water	154.90 \pm 6.91*	163.60 \pm 8.35*	171.60 \pm 7.21*	174.20 \pm 7.16*	175.90 \pm 2.84*
MCH (pg)	有水 With water	22.08 \pm 0.95*	24.80 \pm 2.91*	24.60 \pm 2.07*	22.07 \pm 2.15*	24.65 \pm 4.0*
	无水 Without water	23.44 \pm 3.68*	24.02 \pm 2.57*	26.82 \pm 1.92*	26.42 \pm 1.43*	27.43 \pm 1.39*
HCT (%)	有水 With water	16.16 \pm 0.81*	18.60 \pm 2.20*	19.57 \pm 3.96*	22.70 \pm 2.33*	22.73 \pm 1.61*
	无水 Without water	20.62 \pm 1.67*	19.57 \pm 1.43*	20.6 \pm 0.90*	19.98 \pm 4.81*	20.83 \pm 3.35*

注:同一行中具不同字母标记的值表示差异显著($P < 0.05$)

有随保活时间的增长而浓度升高的趋势,葡萄糖浓度 GLU、胆碱脂酶的有效单位 CHE 有随保活时间增长而浓度或有效单位下降的趋势。在相同的保活时间里,有水保活与无水保活大菱鲆血液中的 GLU、BUN、CR 和 UA 的差异极显著($P<0.01$),有水保活大菱鲆血液中的 GLU、BUN、CR 和 UA 浓度明显低于无水的;有水保活大菱鲆血液中的 CHE 有效单位 24 h 和 36 h 比无水保活的低,48 h 后,无水保活的 CHE 有效单位显著下降,且有水保活大菱鲆血液中的 CHE 有效单位比无水保活的高。

表 4 3℃ 保活过程中大菱鲆血液生化指标的变化

Table 4 Blood biochemical indices of turbot kept alive at 3℃

项目 Item	组别 Group	24h	36h	48h	60h	72h
GLU (mmol/L)	有水 With water	4.65±1.03 ^a	4.90±0.91 ^a	4.12±0.97 ^a	3.83±0.33 ^a	3.42±0.80 ^a
	无水 Without water	8.72±1.54 ^b	7.83±0.76 ^b	6.96±0.51 ^a	6.50±0.45 ^a	6.13±0.17 ^a
BUN (mmol/L)	有水 With water	1.30±0.32 ^a	1.48±0.38 ^a	1.60±0.24 ^a	1.65±0.44 ^a	2.30±0.23 ^b
	无水 Without water	2.36±0.11 ^a	2.53±0.15 ^a	2.74±0.24 ^b	2.90±0.18 ^c	3.10±0.22 ^c
CR (μmol/L)	有水 With water	17.0±1.87 ^a	19.2±3.11 ^a	21.4±1.67 ^b	22.0±1.73 ^b	25.3±3.11 ^c
	无水 Without water	28.4±3.85 ^a	35.3±1.50 ^b	38.4±2.70 ^b	43.2±2.68 ^c	47.8±2.11 ^d
UA (μmol/L)	有水 With water	75.0±10.7 ^a	90.0±18.5 ^a	117.6±15.8 ^b	125.5±19.4 ^b	140.7±18.3 ^b
	无水 Without water	157.8±25.5 ^a	174.5±25.4 ^a	206.4±17.5 ^b	219.3±13.6 ^b	238.7±25.5 ^b
CHE (U)	有水 With water	1.287±87 ^a	1.254±152 ^a	1.241±63 ^a	1.203±156 ^a	1.085±63 ^a
	无水 Without water	1.392±72 ^a	1.357±83 ^a	1.087±104 ^a	845±53 ^b	648±47 ^a

注:同一行中具不同字母标记的值表示差异显著($P<0.05$)

3 讨论

大菱鲆属于冷水鱼类,高淳仁等(2006)提出,大菱鲆适应生长温度 8~22℃,最适生长温度是 16~20℃。Brown 等(1984)指出,水温降低,鱼的活动量明显减少,能减缓鱼的代谢作用。本实验暂养海水温度 6±1℃,试验温度为 3±0.1℃,大菱鲆基本不摄食,活动量小,消耗的氧气很少。因此,保证了试验中的大菱鲆有很高的成活率,有水保活存活率 100%;并且能够长时间无水保活,无水保活 60h 时,存活率达 95%。

Liu 等(1997)认为,氧气在组织中的运输和传递最终取决于血红蛋白的性质,增加血氧亲和力、血红蛋白体积或者浓度,增强糖原在组织中的储存力是鱼类对慢性低氧张力的适应。由表 3 可见,大菱鲆血液中的红细胞数 RBC 随保活时间的增加而没有明显的趋势变化。血红蛋白 HGB、平均红细胞体积 MCV 和平均胞血红蛋白量 MCH 随时间增加而增高,并且相同的保活时间下,测得无水保活的大菱鲆的 HGB、MCV 和 MCH 高于有水的。这表明,大菱鲆在组织内氧不足时,是通过增加血红蛋白体积来提高单个红细胞携氧能力,适应在低氧环境中生活和氧在组织中缓慢释放。

卢宗藩等(1983)的研究表明,在控制蛋白质的摄入量、活动相对恒定时,测定血清 BUN、CR 和 UA 的含量能有效地反映肾脏的排泄功能。由表 4 可见,大菱鲆血液中的 BUN、CR 和 UA 的含量,随保活时间增加而增高,72h 时有水保活血液中的 BUN、CR 和 UA 分别比 24h 时增加了 76.92%、48.82% 和 87.60%;无水保活分别增加 31.36%、68.31% 和 51.27%。无水保活的大菱鲆血液中 BUN、CR 和 UA 的浓度显著高于有水保活的($P<0.01$)。文献指出,正常情况,鱼血液中的总氨氮浓度与水中的氨氮浓度呈正相关,Le Ruyet 等(2003)研究表明,氨主要以 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的形式通过鳃扩散,在高氨环境下,鳃排氨困难,尿量增加是一种解氨毒的方法。Rasmussen 等(1996)提出,大菱鲆对非离子氨安全浓度(产生急性毒性症状最低值的 1/10)为 0.1mg/L NH_3 。实验中,血液中的代谢产物不能被有效地排出鱼体,特别是无水保活大菱鲆血液中代谢产物浓度更高。血液中的尿素氮含量过高时,鱼体的氨氮含量也会高,会引起急性氨氮中毒,这是导致大菱鲆长时间无水保活死亡的原因之一。试验结果表明,大菱鲆血液中 BUN 含量 3.00mmol/L 是判断大菱鲆无水保活中可能发生急性氨

氮中毒重要的参考值。

胆碱脂酶 CHE 包括乙酰胆碱脂酶和丁酰胆碱脂酶两类,乙酰胆碱脂酶的功能是在组织内迅速水解消除乙酰胆碱的作用,乙酰胆碱是胆碱能神经(如副交感神经、运动神经和交感神经节前纤维等)末稍释放的一种神经介质。当神经末稍受刺激引起兴奋时,释放乙酰胆碱,与胆碱能受体结合,发挥神经-肌肉的兴奋传递作用。随后,乙酰胆碱即被该酶水解而失去作用。丁酰胆碱脂酶在神经传导方面,也有相似的作用。本实验结果表明,CHE 有效单位与大菱鲆的生理活度具有正相关性,也就是说,鱼的生理活度高,检测到 CHE 的有效单位多,反之同样成立。利用检测 CHE 有效单位,开发简单便携的检测器,能快速的检测出鲜活水产品在保活运输过程的相对活度。

参 考 文 献

- 田一标,陈申如,杨远帆. 2004. 黑鲷无水保活技术的初步研究. 集美大学学报, 9:221~225
- 田朝阳. 2000. 石斑鱼长距离保活运输技术. 渔业现代化, 6:26
- 卢宗藩. 1983. 家畜实验动物生理生化参数. 北京: 农业出版社, 127~129
- 刘洪,殷邦忠,姚健,梁荫青. 1999. 牙鲆无水保活技术. 中国水产科学, 6(2):101~104
- 李才根. 2004. 水产品暂养与活体运输技术. 北京: 金盾出版社, 6~17
- 张恒,汪玉祥,冒森莉. 2008. 淡水鱼碳酸法无水保活技术. 水产科技情报, 35(5):236
- 高淳仁,王印度,马爱军. 2006. 温度对大菱鲆幼鱼生长、成活率和体内蛋白酶活性的影响. 海洋水产研究, 27(6):33~36
- 雷霁霖,刘新富,马爱军. 1999. 大菱鲆的引进与驯养试验. 中国动物学会编, 中国动物科学研究. 北京: 中国林业出版社, 408~413
- 雷霁霖. 2003. 大菱鲆养殖技术. 上海: 上海科学出版社, 12~31
- 雷霁霖,马爱军,陈超,庄志猛. 2005. 大菱鲆养殖现状与可持续发展. 中国工程科学, 5:30~33
- 雷霁霖,门强. 2002. 大菱鲆“温室大棚+深井海水”工厂化养殖模式. 海洋水产研究, 23(4):1~7
- Brown, J. A., Jones, A., and Matty, A. J. 1984. Oxygen metabolism of farmed turbot. The fish size and water temperature on metabolism rate. Aquaculture, 36:273~281
- Liu, H., Sakurai, Y., Munehara, H. et al. 1997. Diel rhythms of oxygen consumption and activity level of juvenile flounder *Paralichthys olivaceus*. Fisheries Science, 63(5):655~658
- Person-Le Ruyet, J. P., Lamers, A., Le Roux, A. et al. 2003. Long-term ammonia toxicity in juvenile turbot. Journal of Fish Biology, 62:879~894
- Rasmussen, R. S., and Korsgaard, B. 1996. The effects of external ammonia on growth and food utilization of juvenile turbot. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 205:35~48
- Shields, R. J. 2001. Larviculture of marine finfish in Europe. Aquaculture, 200:55~88