

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.20157

## 不同温度条件下黑足鲍干露耐受能力和生化响应的模拟研究

刘毅<sup>1,2,3</sup>, 张继红<sup>2,4</sup>, 吴文广<sup>2</sup>, 孙科<sup>2,4</sup>, 杨琚<sup>2</sup>, 朱芸<sup>2,5</sup>, 张紫轩<sup>2,5</sup>, 夏玉莹<sup>2,5</sup>

1. 中国科学院海洋研究所, 海洋生态与环境科学重点实验室, 山东 青岛 266071;
2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071;
3. 中国科学院大学, 北京 100049;
4. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071;
5. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

**摘要:** 为了解黑足鲍(*Haliotis iris*)在不同温度条件下对干露的耐受能力及生化响应情况, 于2019年11月在新西兰进行了黑足鲍的室内可控实验。结果显示, 黑足鲍的耐干露能力随着温度的升高而降低, 4 °C、10 °C和15 °C条件下干露胁迫的半致死时间(LT<sub>50</sub>)分别为: 48.80 h、33.75 h和23.20 h; 各实验组的细胞色素氧化酶(CCO)活力呈现持续降低的趋势, 从0 h的11.45~12.70 U/mg降低到1.43~1.83 U/mg, 温度越高的实验组 CCO 活力降低的速率越快, 且各实验组 CCO 活力的最小值显著低于对照组( $P < 0.05$ ); 延胡索酸还原酶(FRD)、乳酸脱氢酶(LDH)活力和一氧化氮(NO)含量呈先升高再降低趋势, 温度越高的实验组, 指标到达最大值的时间越短; 过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)只在4 °C实验组表现出协同作用, 其余两个实验组 SOD 酶未被激活; 丙二醛(MDA)含量持续升高, 从0 h的2.71~3.01 μmol/mg增长到8.62~9.10 μmol/mg, 温度越高的实验组, MDA 含量到达最大值的时间越短, 且含量显著高于对照组( $P < 0.05$ )。研究表明, 黑足鲍可以通过保持一定时间的有氧呼吸和糖酵解的异化作用来应对干露胁迫, 但是随着干露时间的延长, 代谢系统紊乱, 乳酸大量积累。同时, 干露胁迫也导致了免疫相关功能的紊乱, 各种因素共同作用从而影响其生存。

**关键词:** 黑足鲍; 干露; 耐受能力; 呼吸代谢酶; 免疫指标

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)11-1316-09

黑足鲍(*Haliotis iris*)是世界大型鲍类之一, 自然分布于新西兰沿海岸域, 属于当地特有种, 其肉质鲜美, 营养价值高, 外壳颜色亮丽, 被誉为世界上最美丽的贝壳, 是重要的海珍品。将黑足鲍引入我国, 可以有效丰富我国水产养殖的种质资源, 提高经济收益, 为我国水产养殖绿色发展提供新的活力, 相关引进工作已引起政府部门和许多学者的兴趣<sup>[1-3]</sup>。

受当地政府出口管控的限制, 目前只能通过干露空运成体黑足鲍的方式进行引进。长时间的

干露运输, 黑足鲍会面临多种环境因子的胁迫, 并会引发黑足鲍机体的应激反应, 对黑足鲍的存活造成严重的影响。因此, 了解运输过程中黑足鲍的耐干露能力和生化响应策略, 对后期的引种工作具有重要的指导意义<sup>[4]</sup>。

目前, 关于干露胁迫对贝类影响的研究报道较多, 但是, 不同物种, 甚至是亲缘关系较近的同属生物, 对干露胁迫的耐受能力和生化响应也有明显差异<sup>[5-10]</sup>。目前未见关于黑足鲍对干露胁迫的耐受能力和生化响应的研究报道<sup>[11-12]</sup>。干

收稿日期: 2020-06-04; 修订日期: 2020-07-06.

基金项目: 农业农村部农业国际合作交流项目(“一带一路”热带国家水产养殖科技创新合作); 中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2018GH08).

作者简介: 刘毅(1985-), 工程师, 从事海洋生态学研究. E-mail: liuyi@ysfri.ac.cn

通信作者: 张继红, 研究员, 从事海洋生态和养殖容纳量研究. E-mail: zhangjh@ysfri.ac.cn

露耐受能力可以为运输提供参考,呼吸代谢和免疫功能反映了生物生理响应情况、代谢能力和对外界刺激的适应、抵抗能力<sup>[13]</sup>,是生物应对胁迫的响应机理研究中的重要内容。因此,本研究在新西兰进行了室内模拟实验,研究了 3 个温度条件下(4 °C、10 °C、15 °C)黑足鲍的半致死时间以及呼吸代谢酶[细胞色素氧化酶(CCO)、延胡索酸还原酶(FRD)、乳酸脱氢酶(LDH)]和免疫功能指标[过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)和一氧化氮(NO)、丙二醛(MDA)]的变化,探究黑足鲍运输过程中对干露胁迫的响应机理,为黑足鲍的成功引进提供基础数据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

实验用黑足鲍和海水于 2019 年 11 月取自新西兰基督城沿岸,鲍的壳长为 12.5~13 cm (大小符合新西兰出口标准),体重 300~400 g, 取样海区海水盐度 31.2, pH 7.77, 水温 15.7 °C, 溶解氧 8.23 mg/L。鲍壳表面清理干净后,按照取样时的海水温度(15 °C)在循环水系统中暂养,系统盐度 31, pH 7.8, 持续充氧,保持溶解氧浓度为 8 mg/L 左右,暂养期间每天分早晚投喂海带,并保持每天换水和监测水质指标变化情况。暂养 3 d 后,选取无外伤、可正常摄食、活力好的黑足鲍进行实验。

### 1.2 方 法

**1.2.1 实验设计** 实验分为 3 个实验组和 1 个对照组,每个处理设置 3 个平行,从暂养池中直接取鲍鱼进行干露实验,每个平行 20 只黑足鲍。实验组模拟了运输中可能遇到的温度情况,分别是:4 °C 实验组(理想条件),将黑足鲍置于托盘中,用湿毛巾覆盖置于 4 °C 冰箱中;10 °C 实验组(实际情况),将黑足鲍用湿毛巾覆盖,置于加冰块的保温箱中,实验过程中保持温度在 10 °C 左右;15 °C 实验组(极端情况),将黑足鲍用湿毛巾覆盖,直接置于 15 °C 恒温且无阳光直晒的实验室内;暂养的黑足鲍作为对照组。实验开始后,每 6 h 观察和记录死亡情况(用玻璃棒碰触鲍触角,完全不动即为死亡),每 12 h 随机挑选 3 只存活的黑足鲍取内脏团和肌肉组织,直至所有黑足鲍全部死

亡时,实验结束。

**1.2.2 样品处理和测定方法** 本实验主要测定黑足鲍呼吸代谢相关酶(黑足鲍肌肉组织中的 CCO、FRD 和 LDH)和免疫相关酶(内脏团中的 CAT、SOD 和 NO、MDA)。酶活力采用试剂盒测定,NO 和 MDA 含量采用分光光度计法,具体的样品获取、处理和测定方法参考文献中的方法进行<sup>[14-16]</sup>。

**1.2.3 耐受能力评价指标和统计分析** 各实验组的死亡率与时间进行回归分析,建立回归方程,根据方程求得不同温度干露条件下的半致死时间(LT<sub>50</sub>)。相关性分析利用 SPSS 软件进行(单因素方差分析, one-way ANOVA),显著性差异水平设为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同温度干露胁迫对黑足鲍死亡率的影响

各实验组黑足鲍死亡情况见图 1。实验开始后 18 h, 10 °C 和 15 °C 实验组黑足鲍开始出现死亡,其中 15 °C 实验组黑足鲍 36 h 即全部死亡,10 °C 实验组黑足鲍在 48 h 全部死亡。4 °C 实验组黑足鲍在 42 h 开始出现死亡,并在 60 h 时全部死亡。整个实验过程中,对照组黑足鲍未发现死亡。同一干露时刻,不同处理组的死亡率差异显著 ( $P < 0.05$ )。

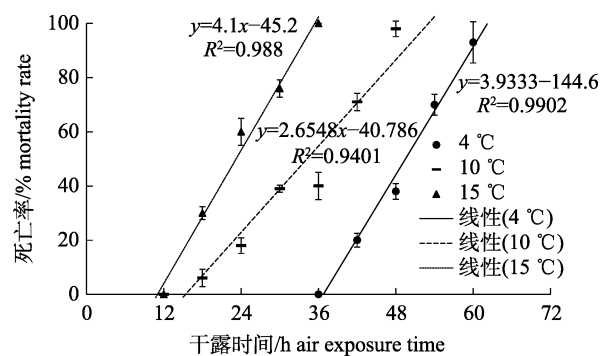


图 1 不同干露处理下黑足鲍的死亡率

Fig. 1 The mortality rates of *Haliotis iris* in different dry exposure periods

将各实验组黑足鲍的死亡率与时间进行回归分析,分别得到不同条件下干露与累积死亡率的直线关系,且线性显著相关。由线性回归方程得到不同干露条件下黑足鲍的半致死时间(LT<sub>50</sub>)分

别为: 4 °C,  $LT_{50}=48.80$  h; 10 °C,  $LT_{50}=33.75$  h; 15 °C,  $LT_{50}=23.20$  h。

### 2.2 干露胁迫对黑足鲍呼吸代谢酶的影响

**2.2.1 干露胁迫对 CCO 活力的影响** 干露胁迫下, 黑足鲍肌肉组织中 CCO 活力的变化如图 2 所示。从图中可以看出, 随着干露胁迫时间的延长, 各实验组 CCO 活力的变化都呈现持续降低的趋势, 从 0 h 的 11.45~12.70 U/mg 降低到 1.43~1.83 U/mg。12 h 时 4 °C 实验组 CCO 活力比对照组略有降低, 但差异不显著( $P>0.05$ ), 10 °C 和 15 °C 实验组 CCO 活力显著低于对照组( $P<0.05$ ); 其余时间点, 实验组 CCO 活力均显著低于对照组, 且各组之间差异显著( $P<0.05$ ); 除对照组外, 各实验组 CCO 活力在不同的时间点差异显著( $P<0.05$ )。干露温度越高, CCO 活力下降的速率越快, 各实验组分别在 24 h (15 °C 实验组)、36 h (10 °C 实验组)、48 h (4 °C 实验组)时降到最低。

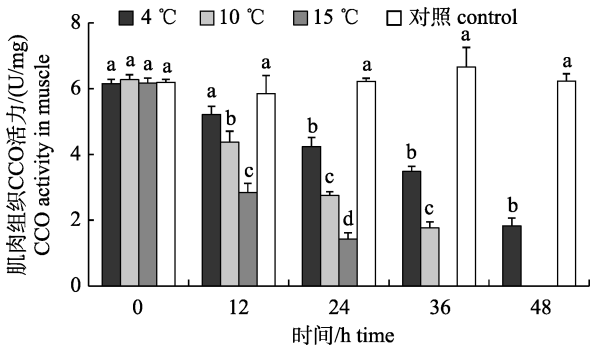


图 2 干露胁迫对黑足鲍 CCO 活力的影响

不同字母上标表示不同实验组在该时间点差异显著( $P<0.05$ )。 Fig. 2 Effects of dry exposure on CCO activities of *Haliotis iris* Different letters indicate significant difference at the same time point ( $P<0.05$ ).

**2.2.2 干露胁迫对 FRD 活力的影响** 干露胁迫下, 黑足鲍肌肉组织中 FRD 活力的变化如图 3 所示。随着干露胁迫时间的延长, 各实验组 FRD 活力的变化均呈现先升高后降低的趋势。温度越高, FRD 活力到达最大值的时间越短。12 h 时, 各实验组的 FRD 活力都有升高趋势, 但 4 °C 和 10 °C 实验组的 FRD 活力与对照组差异不显著( $P>0.05$ ), 而 15 °C 实验组的 FRD 活力到达最大值(16.88 U/mg), 并显著高于对照组(11.45 U/mg)( $P<0.05$ ); 24 h 时, 10 °C 实验组的 FRD 活力到达最大值(17.66 U/mg),

15 °C 实验组的 FRD 活力开始呈现下降趋势; 36 h 时, 4 °C 实验组的 FRD 活力达到最大值(16.53 U/mg), 10 °C 实验组的 FRD 活力开始呈现下降趋势; 48 h 时, 4 °C 实验组的 FRD 活力开始呈现下降趋势。

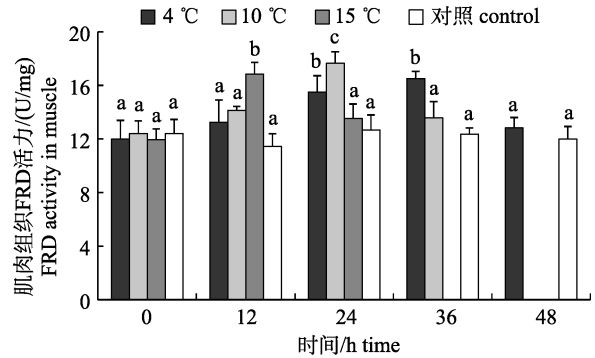


图 3 干露胁迫对黑足鲍 FRD 活力的影响

不同字母上标表示不同实验组在该时间点差异显著( $P<0.05$ )。 Fig. 3 Effects of dry exposure on FRD activities of *Haliotis iris* Different letters indicate significant difference at the same time point ( $P<0.05$ ).

**2.2.3 干露胁迫对 LDH 活力的影响** 干露胁迫下, 黑足鲍肌肉组织中 LDH 活力的变化如图 4 所示。随着干露胁迫时间的延长, 各实验组 LDH 活力的变化与 FRD 相似, 均呈现先升高后降低的趋势, 温度越高的实验组, LDH 活力到达最大值的时间越短。12 h 时, 15 °C 实验组的 LDH 活力到达最大值(175.33 U/mg); 24 h 时, 10 °C 实验组的 LDH 活力到达最大值(176.00 U/mg), 15 °C 实验组的 LDH 开始呈现下降趋势; 36 h 时, 4 °C 实验组的 LDH 活力到达最大值(163.67 U/mg), 10 °C

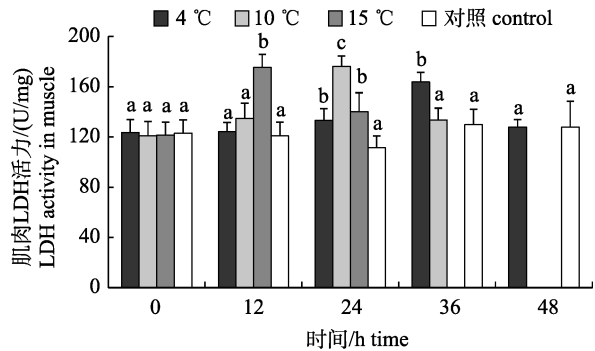


图 4 干露胁迫对黑足鲍 LDH 活力的影响

不同字母上标表示不同实验组在该时间点差异显著( $P<0.05$ )。 Fig. 4 Effects of dry exposure on LDH activities of *Haliotis iris* Different letters indicate significant difference at the same time point ( $P<0.05$ ).

实验组的 LDH 活力开始呈现下降趋势; 48 h 时, 4 °C 实验组的 LDH 活力开始呈现下降趋势。

### 2.3 干露胁迫对黑足鲍免疫指标的影响

**2.3.1 干露胁迫对 CAT 活力的影响** 干露胁迫下, 黑足鲍内脏团中 CAT 活力的变化如图 5 所示。随着干露胁迫时间的延长, 各实验组 CAT 活力的变化均呈现先升高后降低的趋势。10 °C 和 15 °C 实验组的 CAT 活力在 12 h 时同时到达最大值(24.70 U/mg 和 25.73 U/mg); 24 h 时 4 °C 实验组的 CAT 活力到达最大值(26.61 U/mg), 10 °C 和 15 °C 实验组的 CAT 活力开始呈现下降趋势, 其中 15 °C 实验组的 CAT 活力(17.78 U/mg)下降趋势显著( $P<0.05$ ); 36 h 时, 10 °C 实验组的 CAT 活力(17.94 U/mg)显著低于对照组( $P<0.05$ ); 48 h 时, 4 °C 实验组的 CAT 活力(17.06 U/mg)显著低于对照组( $P<0.05$ )。

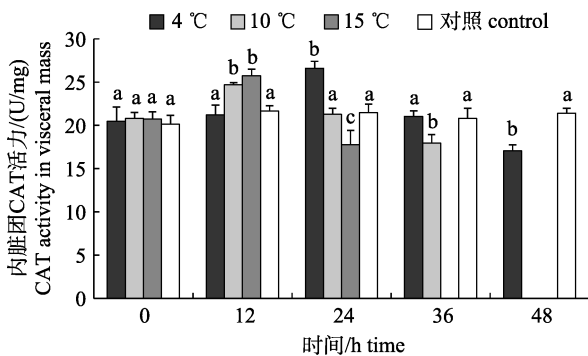


图 5 干露胁迫对黑足鲍 CAT 活力的影响

不同字母上标表示不同实验组在该时间点差异显著( $P<0.05$ ).  
Fig. 5 Effects of dry exposure on CAT activities of *Haliotis iris*  
Different letters indicate significant difference at the same time point ( $P<0.05$ ).

**2.3.2 干露胁迫对 SOD 活力的影响** 干露胁迫下, 黑足鲍内脏团中 SOD 活力的变化如图 6 所示。4 °C 实验组 SOD 酶活力被短暂激活, 而其余实验组在实验过程中, SOD 未被激活并呈现持续降低的趋势。从 0 h 的 18.75~19.34 U/mg 降低到 15.69~17.66 U/mg, 温度越高的实验组, SOD 活力降低的速率越快。

**2.3.3 干露胁迫对 MDA 含量的影响** 干露胁迫下, 黑足鲍内脏团中 MDA 含量的变化如图 7 所示。随着干露胁迫时间的延长, 各实验组 MDA 含量呈现持续升高的趋势。从 0 h 的 2.71~3.01  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  增

长到 8.62~9.10  $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 。温度越高的实验组, MDA 含量到达最大值的时间越短, 15 °C 实验组的 MDA 含量在 24 h 到达最大值(8.62  $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ), 10 °C 实验组的 MDA 含量在 36 h 到达最大值(9.10  $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ), 4 °C 实验组的 MDA 含量在 48 h 到达最大值(8.99  $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ), 即各实验组黑足鲍内脏团的 MDA 含量均在死亡前到达最大值。除对照组外, 各实验组组内的 MDA 含量在不同的时间点差异显著( $P<0.05$ )。

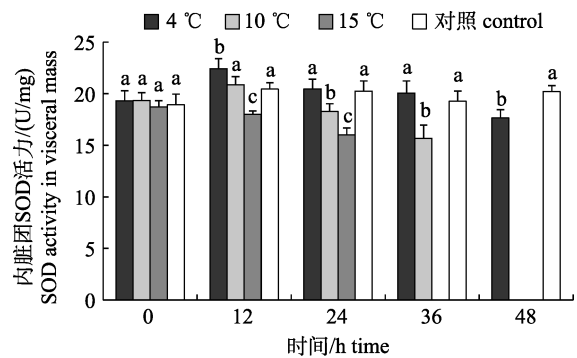


图 6 干露胁迫对黑足鲍 SOD 活力的影响

不同字母上标表示不同实验组在该时间点差异显著( $P<0.05$ ).  
Fig. 6 Effects of dry exposure on SOD activities of *Haliotis iris*  
Different letters indicate significant difference at the same time point ( $P<0.05$ ).

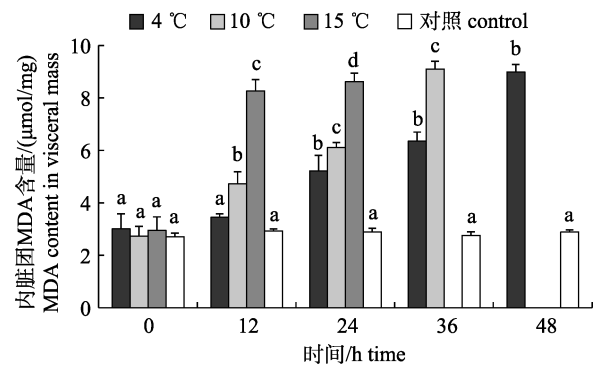


图 7 干露胁迫对黑足鲍 MDA 含量的影响

不同字母上标表示不同实验组在该时间点差异显著( $P<0.05$ ).  
Fig. 7 Effects of dry exposure on the MDA content of *Haliotis iris*  
Different letters indicate significant difference at the same time point ( $P<0.05$ ).

**2.3.4 干露胁迫对 NO 含量的影响** 干露胁迫下, 黑足鲍内脏团中 NO 含量的变化如图 8 所示。随着干露胁迫时间的延长, 各实验组 NO 含量变化基本呈现先升高再降低的趋势。0 h 时和 12 h 时各实验组和对照组差异不显著( $P>0.05$ ), 但 12 h 时,

10 °C 和 15 °C 实验组 NO 含量略高于对照组; 24 h 时, 4 °C 实验组 NO 含量达到最大值(3.54  $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ), 并显著高于其他处理组( $P < 0.05$ ), 而 15 °C 实验组 NO 含量则到达最小值(1.11  $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ), 并显著低于其他处理组( $P < 0.05$ ); 36 h 时, 10 °C 处理组 NO 含量到达最小值(0.92  $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ); 48 h 时, 4 °C 处理组的 NO 含量降低到 2.03  $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 。

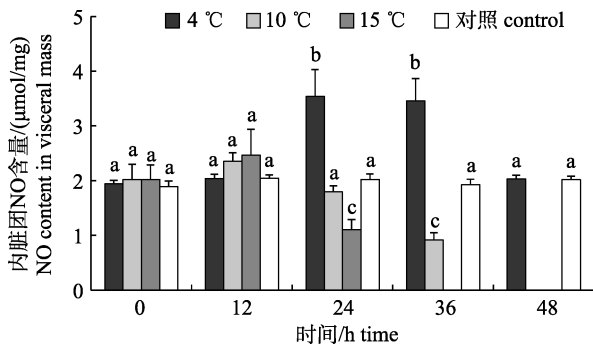


图 8 干露胁迫对黑足鲍 NO 含量的影响

不同字母上标表示不同实验组在该时间点差异显著( $P < 0.05$ )。

Fig. 8 Effects of dry exposure on NO content of *Haliotis iris*. Different letters indicated significant difference at the same time point ( $P < 0.05$ ).

### 3 讨论

#### 3.1 黑足鲍的耐干露能力

由于受生物个体差异的影响, 学者们较为统一地认为半致死浓度  $\text{LC}_{50}$  或半致死时间  $\text{LT}_{50}$  最能反映生物对胁迫因子的耐受能力<sup>[5]</sup>。因此, 本研究以半致死时间作为黑足鲍耐干露能力的评价指标。结果显示, 10 °C 条件下(实际运输过程中的温度), 黑足鲍的  $\text{LT}_{50}$  为 33.75 h, 其耐干露能力远低于太平洋牡蛎、菲律宾蛤仔和四角蛤仔等双壳贝类<sup>[6,10]</sup>。由于黑足鲍在引进过程中运输时间可能达 30 h 以上, 因此在现有的运输条件和技术下, 黑足鲍的耐干露能力可能会成为制约其成功引进的关键因素。所以, 根据本研究结果, 建议在未来黑足鲍的引进过程中, 应注意以下几个方面: 首先, 从境外运输到国内暂养, 这一过程总时长尽量不超过 30 h; 其次, 运输过程中加大冰块比例, 使运输温度保持更低; 最后, 应直接在国内进口海关当地的科研院所或养殖公司进行暂养, 待黑足鲍恢复活力后再次进行二次运输, 国内有条件

的情况下应尽量保证带水充氧运输。

#### 3.2 干露胁迫对黑足鲍呼吸代谢的影响

黑足鲍在低氧或者缺氧条件下肌肉组织对糖酵解的依赖更大<sup>[12]</sup>, 由于肌肉组织对能量需求较高, 其呼吸酶的活力具有一定代表性, 因此本研究选取黑足鲍肌肉组织中的相关酶。

生物体的呼吸作用主要依靠有氧呼吸完成<sup>[17]</sup>, 呼吸酶是生物体异化和供能作用的直接参与者, 其活力对生物体有重要影响<sup>[18]</sup>。Rustin 等<sup>[19]</sup>和 Simon 等<sup>[20]</sup>研究发现, CCO 作为有氧呼吸的关键酶, 其活力可以评价有氧呼吸的程度和速率。缺氧时, 甲壳类、贝类等海洋无脊椎动物体内红细胞储存的氧能够满足一定时间的有氧呼吸<sup>[21]</sup>, 随着时间的推移, 细胞内氧气含量减少, 有氧呼吸不能正常进行, 导致能量需求得不到满足。为了适应低氧环境, 海洋生物会对新陈代谢的速率进行调节, 许多研究发现, 低氧胁迫下海洋生物会通过降低 CCO 活力来调节自身的呼吸代谢<sup>[15]</sup>。本研究中, 黑足鲍可以在干露条件下保持一定时间的有氧呼吸, 温度越低有氧呼吸保持的时间越久, 可能是低温干露时黑足鲍的生理活动较为低迷, 对氧的需求量也相对较少。

不同的响应机理造成了海洋生物对缺氧胁迫耐受能力的差异<sup>[18]</sup>, 糖酵解过程是海洋生物在低氧或缺氧状态下的主要供能反应, 贝类对低氧的耐受能力一般要强于鱼类、甲壳类和棘皮类等<sup>[22-23]</sup>, 主要原因是贝类在缺氧条件下还会发生糖酵解的异化反应<sup>[24]</sup>。FRD 是糖酵解发生异化以及异化过程中最重要的酶<sup>[25-26]</sup>。缺氧条件下, 糖酵解的终产物丙酮酸可以在 LDH 的催化下形成乳酸, 通常情况, 海洋底栖生物在缺氧胁迫下会选择葡萄糖—琥珀酸途径来应对, 因为该反应可以有效避免乳酸等酸性物质的积累, 从而维持细胞的稳定<sup>[27]</sup>。本研究中, FRD 和 LDH 活力的变化表明, 黑足鲍在干露缺氧条件下, 可以选择糖酵解的异化反应, 同时抑制 LDH 的活性避免乳酸的生成。随着时间的延长, 代谢系统受到干露缺氧的影响而紊乱, FRD 活力降低说明黑足鲍已不能采取糖酵解的异化过程来为自身供能, LDH 活力的变化则表明黑足鲍体内的乳酸开始大量积累, 威胁了黑足鲍的

生存。干露的温度越高, 影响程度越剧烈, 黑足鲍的调节出现紊乱越早, 耐受能力越差。

综上所述, 黑足鲍在干露条件下的响应机理可能分为三个阶段: 开始阶段, 通过降低自身活性保持有氧呼吸; 中间阶段, 采取糖酵解以及糖酵解的异化作用来维持基本的能量供应, 同时抑制乳酸的产生; 最后阶段, 代谢系统紊乱, 乳酸大量积累, 最终导致死亡。与其他贝类相比, 黑足鲍在干露前期, 响应机理要强于栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 的磷酸烯醇式丙酮酸-草酰乙酸-琥珀酸途径, 有效避免了乳酸的积累; 与菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*) 相比, 都采取了糖酵解的异化反应并且避免了乳酸的产生, 但黑足鲍保持时间较短<sup>[18]</sup>。

### 3.3 干露胁迫对免疫功能的影响

黑足鲍属于无脊椎动物, 免疫功能主要依靠非特异性免疫来维持, 内脏团是防御的主要场所, 因此选取黑足鲍内脏团中的 CAT、SOD 和 NO、MDA 作为免疫指标<sup>[28]</sup>。贝类在受到外界刺激时, 免疫相关酶会积极响应, 但是随着时间的延长, 这些酶的活性可能受到影响, 从而使生物体暴露在其他威胁下<sup>[29-30]</sup>。SOD 和 CAT 的活力可以用来评价贝类免疫能力的强弱。现有的研究表明, 在低氧胁迫下, 贝类的抗氧化酶 CAT 和 SOD 会提高活力保护机体免受氧化损伤,  $O_2^-$  可以在 SOD 催化作用下生成  $O_2$  和  $H_2O_2$ , 而  $H_2O_2$  则可以在 CAT 的作用下生成  $H_2O$ , 因此, SOD 和 CAT 可以在抗氧化系统中协同作用, 紧密配合<sup>[31]</sup>。本研究中, 干露胁迫下 4 °C 实验组黑足鲍内脏团中 SOD 和 CAT 都被激活, 且 SOD 酶先被激活可以很好地解释两种酶的协同作用; 而 10 °C 实验组和 15 °C 实验组 SOD 酶未被激活, 可能的原因是较高温度的干露胁迫使黑足鲍的免疫能力受到干扰, SOD 和 CAT 不能协同作用, 严重影响了黑足鲍的存活。

另外, MDA 和 NO 的含量也是评价贝类免疫功能的重要指标。MDA 的含量可以反映细胞膜损伤程度, NO 可以从多方面增强非特异性免疫功能, 从而对机体产生保护作用<sup>[32]</sup>。本研究各实验组 MDA 含量均呈现升高趋势, 说明干露胁迫下黑足鲍代谢出现异常, 自由基造成了生物膜的氧化

损伤从而使 MDA 升高, 这种损伤一直持续到黑足鲍全部死亡。NO 含量的变化则呈现先升高后降低的趋势, 说明在干露胁迫下, 黑足鲍体内可以合成适量的 NO 对机体产生一定的保护作用, 但是随着实验的进行 NO 含量开始下降, 干露胁迫可能对黑足鲍生理功能产生了不可逆的影响, 从而造成了黑足鲍的死亡。

通过与菲律宾蛤仔干露胁迫下免疫功能情况<sup>[16]</sup> 的对比分析发现, 干露胁迫对黑足鲍的免疫功能影响较大。因此, 虽然干露胁迫下黑足鲍与菲律宾蛤仔采取了相同的响应机理, 但黑足鲍保持的时间较短, 可能的原因是黑足鲍免疫功能的紊乱导致其同时遭受了其他因素的威胁。

### 3.4 小结

干露胁迫下, 黑足鲍体内 FRD、LDH 和 NO 都呈现先升高后降低的趋势, 其最大值和出现拐点的时间可能是判断黑足鲍生理状况的重要参数, 因此, 该 3 项指标也可能是干露胁迫下检测黑足鲍生理状况的重要指标。短时间的干露胁迫, 黑足鲍可通过保持有氧呼吸和糖酵解的异化作用来应对, 随着干露胁迫时间的延长, 黑足鲍呼吸代谢出现紊乱、免疫系统损伤, 进而导致黑足鲍死亡。另外, 我们发现运输过程的温度与耐干露能力呈反比关系, 在目前的运输条件下, 运输过程的整个时间应控制在 33 h 内; 采用低温运输 (4 °C), 耐受时间可达 48 h, 以上研究为黑足鲍引进工作提供了基础数据。

### 参考文献:

- [1] Hou X G. On biological characteristics of significant economical abalones in the world[J]. Shandong Fisheries, 1998, 15(4): 20-22. [侯旭光. 世界重要经济鲍的生物学特征[J]. 齐鲁渔业, 1998, 15(4): 20-22.]
- [2] Guo Z S. Study on crossbreeding between abalone *Haliotis discus hannai* and *Haliotis iris*[D]. Jinan: Shandong University, 2014. [郭战胜. 皱纹盘鲍与黑足鲍杂交育苗研究[D]. 济南: 山东大学, 2014.]
- [3] Zheng H. The effect of temperature on the growth of hybrid abalone (*Haliotis discus hannai* Ino ♀ × *Haliotis iris* ♂) and the analysis research of HSP70 expression[D]. Jinan: Shandong University, 2015. [郑海. 温度对杂交鲍(*Haliotis discus hannai* Ino ♀ × *Haliotis iris* ♂)生长的影响及 HSP70 表达的分析研究[D]. 济南: 山东大学, 2015.]

- [4] Li Y X, Yan L X, Yu D, et al. Comparison of air exposure stress resistances of post-harvested *Yesso scallop* with different sizes[J]. Fisheries Science, 2019, 38(4): 443-450. [李亚焯, 闫丽新, 于笛, 等. 不同规格虾夷扇贝捕后耐干露特性比较[J]. 水产科学, 2019, 38(4): 443-450.]
- [5] Ma G F, Yang F, Guo W X, et al. Comparative tolerance to air exposure and freshwater immersion between two clams *Macra chinensis* and *M. veneriformis*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2013, 28(1): 44-48. [马贵范, 杨凤, 郭文学, 等. 中国蛤蜊和四角蛤蜊对干露和淡水浸泡的耐受性比较[J]. 大连海洋大学学报, 2013, 28(1): 44-48.]
- [6] Yu R H, Wang Z P, Kong L F, et al. A Study of the survival rate of pacific oysters in different exposure states at different development stages[J]. Periodical of Ocean University of China, 2006, 36(4): 617-620. [于瑞海, 王昭萍, 孔令锋, 等. 不同发育期的太平洋牡蛎在不同干露状态下的成活率研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2006, 36(4): 617-620.]
- [7] Yu R H, Xin R, Zhao Q, et al. Survival rate on the different stages of *Argopecten irradians* in the different exposure times[J]. Marine Sciences, 2007, 31(6): 6-9. [于瑞海, 辛荣, 赵强, 等. 海湾扇贝不同发育阶段耐干露的研究[J]. 海洋科学, 2007, 31(6): 6-9.]
- [8] Li Z H, Wang G D. Tolerance of *Mercenaria mercenaria* juveniles to exposure to freshwater bath, drying and low temperature[J]. Fisheries Science, 2004, 23(6): 14-16. [李忠泓, 王国栋. 硬壳蛤稚贝对淡水浸泡、干露和低温的耐受能力[J]. 水产科学, 2004, 23(6): 14-16.]
- [9] Yang F, Tan W M, Yan X W, et al. Effects of exposure to air, immersion in fresh-water on growth and survival of juvenile Manila clam *Ruditapes philippinarum*[J]. Fisheries Science, 2012, 31(3): 143-146. [杨凤, 谭文明, 闫喜武, 等. 干露及淡水浸泡对菲律宾蛤仔稚贝生长和存活的影响[J]. 水产科学, 2012, 31(3): 143-146.]
- [10] Cao C, Kuang S H, Jiang C, et al. Trial on effects of exposure to air or change in salinity on ark shell *Scapharca subcrenata* seedling[J]. Hebei Fisheries, 2007(5): 38, 51. [曹琛, 匡少华, 姜超, 等. 干露及盐度变化对毛蚶苗的影响试验[J]. 河北渔业, 2007(5): 38, 51.]
- [11] Wells R M G, Baldwin J. A comparison of metabolic stress during air exposure in two species of New Zealand abalone, *Haliotis iris* and *Haliotis australis*: Implications for the handling and shipping of live animals[J]. Aquaculture, 1995, 134(3-4): 361-370.
- [12] Baldwin J, Wells R M G, Low M, et al. Tauropine and D-lactate as metabolic stress indicators during transport and storage of live paua, (New Zealand abalone) (*Haliotis iris*)[J]. Journal of Food Science, 1992, 57(2): 280-282.
- [13] 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.]
- [14] Wang J F, He Y M. Experimental Course of Cell Biology[M]. Beijing: Science Press, 2004: 47-51. [王金发, 何炎明. 细胞生物学实验教程[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 47-51.]
- [15] Lian C A, Li J, Li J T, et al. Effects of dry exposure on the respiratory metabolism-related enzymes of *Exopalaemon carinicauda*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(4): 53-60. [连春盎, 李健, 李吉涛, 等. 干露胁迫对脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*)呼吸代谢相关酶的影响[J]. 渔业科学进展, 2017, 38(4): 53-60.]
- [16] Wang W W. Effects of exposure in air on immune index and gene expression in *Ruditapes philippinarum*[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2016. [王文文. 干露胁迫对菲律宾蛤仔免疫指标和基因表达的影响[D]. 大连: 大连海洋大学, 2016.]
- [17] Chen Y Z. General Biology[M]. Beijing: Higher Education Press, 1997. [陈阅增. 普通生物学. 北京: 高等教育出版社, 1997.]
- [18] Li Q. The tolerance of commercial bivalves to hypoxia—taking the *Ruditapes philippinarum* and the *Chlamys farreri* as examples[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2019. [李峻. 经济贝类对低氧耐受性的研究—以菲律宾蛤仔和栉孔扇贝为例[D]. 北京: 中国科学院大学, 2019.]
- [19] Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies[J]. Clinica Chimica Acta, 1994, 228(1): 35-51.
- [20] Simon L M, Robin E D. Relationship of cytochrome oxidase activity to vertebrate total and organ oxygen consumption[J]. International Journal of Biochemistry, 1971, 2(11): 569-573.
- [21] Morris S, Oliver S. Circulatory, respiratory and metabolic response to emersion and low temperature of *Jasus edwardsii*: Simulation studies of commercial shipping methods[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 1999, 122(3): 299-308.
- [22] Rosenberg R, Hellman B, Johansson B. Hypoxic tolerance of marine benthic fauna[J]. Marine Ecology Progress Series, 1991, 79: 127-131.
- [23] Miller D, Poucher S, Coiro L. Determination of lethal dissolved oxygen levels for selected marine and estuarine fishes, crustaceans, and a bivalve[J]. Marine Biology, 2002, 140(2): 287-296.

- [24] Li Q, Sun S, Zhang F, et al. Effects of hypoxia on survival, behavior, metabolism and cellular damage of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*)[J]. PLoS ONE, 2019, 14(4): e0215158.
- [25] Ellington W R. The recovery from anaerobic metabolism in invertebrates[J]. Journal of Experimental Zoology, 1983, 228(3): 431-444.
- [26] Viru M. Differences in effects of various training regimens on metabolism of skeletal muscles[J]. The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness, 1994, 34(3): 217-227.
- [27] Larade K, Storey K B. A profile of the metabolic responses to anoxia in marine invertebrates[M]// Cell and Molecular Responses to Stress, Vol. 3: Sensing, Signaling and Cell Adaptation. Amsterdam: Elsevier Press, 2002: 27-46.
- [28] Zhu M Y, Zou Y L, Wu R J, et al. Accumulation and depuration of paralytic shellfish poisons (PSP) in Chinese scallop *Chlamys farreri*[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2003, 25(2): 75-83. [朱明远, 邹迎麟, 吴荣军, 等. 栉孔扇贝体内麻痹性贝毒的累积与排出过程研究[J]. 海洋学报, 2003, 25(2): 75-83.]
- [29] Parrilla-Taylor D P, Zenteno-Savín T. Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation[J]. Aquaculture, 2011, 318(3-4): 379-383.
- [30] Cooper R U, Clough L M, Farwell M A, et al. Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2002, 279(1-2): 1-20.
- [31] Zhao H F, Feng Y W, Liu X Q, et al. Growth and immune diversity of *Haliotis discus hannai* juvenile abalone with different egg colors[J]. Progress in Fishery Sciences, 2016, 37(6): 110-114. [赵海峰, 冯艳微, 刘相全, 等. 不同卵色皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)幼鲍的生长与免疫比较[J]. 渔业科学进展, 2016, 37(6): 110-114.]
- [32] Zhai Z H, Wang X Z, Ding M X. Cell Biology[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000. [翟中和, 王喜忠, 丁明孝. 细胞生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.]



## Dry exposure stress tolerance and physiological response of black abalone *Haliotis iris* at different temperatures

LIU Yi<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Jihong<sup>2,4</sup>, WU Wenguang<sup>2,4</sup>, SUN Ke<sup>2,4</sup>, YANG Jun<sup>2</sup>, ZHU Yun<sup>2,5</sup>, ZHANG Zixuan<sup>2,5</sup>, XIA Yuying<sup>2,5</sup>

1. Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Science, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;
2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;
4. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China;
5. College of Fishery and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

**Abstract:** New Zealand black abalone *Haliotis iris* is an important aquatic species with high nutritional value and a bright shell. Since initial research was found to possibly effectively enrich aquaculture species in China, there has been much scientific interest in this species. Limited studies have been conducted on the tolerance and physiological response of *H. iris* to desiccation during long-distance transportation, and these studies are important for subsequent experiments and breeding. To investigate *H. iris* tolerance to desiccation at different temperatures, physiological experiments were carried out in New Zealand in November 2019. Variations in *H. iris* respiratory metabolism and immunity were monitored. The results showed that the desiccation tolerance of *H. iris* decreased with higher temperatures. The half-lethal time ( $LT_{50}$ ) under 4, 10, and 15 °C were 48.80, 33.75, and 23.20 h, respectively. During the experiments, cytochrome oxidase (CCO) activity decreased from 11.45–12.70 U/mg at 0 h to 1.43–1.83 U/mg, the CCO activity of the experimental group with high temperatures decreased rapidly, and the minimum value of CCO activity in each experimental group was significantly lower than that in the control group ( $P < 0.05$ ). However, fumarate reductase (FRD), lactate dehydrogenase (LDH), and nitric oxide (NO) activity increased in the beginning and then decreased. Catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) only showed synergy in the 4 °C experimental group, and SOD of the other two experimental groups were not activated. Malondialdehyde (MDA) content increased from 2.71–3.01  $\mu\text{mol/mg}$  at 0 h to 8.62–9.10  $\mu\text{mol/mg}$ , the MDA content of the experimental group with high temperatures reached the maximum value early, and the content was significantly higher than that of the control group ( $P < 0.05$ ). The results implied that *H. iris* could tolerate desiccation by maintaining aerobic respiration and glycolysis to some extent. Thereafter, the metabolic system was disordered, and a large amount of lactic acid was accumulated. Desiccation also lead to the disturbances of immune-related functions, which affected *H. iris* survival under other combined stresses. This study explored the physiological response of *H. iris* under conditions of desiccation, and the results provided a basis for further research. Methods to maintain the physiological state of *H. iris* during long-distance transportation should be investigated in the future.

**Key words:** *Haliotis iris*; air exposure; stress tolerance; respiratory metabolism enzymes; immune indicators

**Corresponding author:** ZHANG Jihong, E-mail: zhangjh@ysfri.ac.cn