

DOI: 10.12264/JFSC2023-0318

珍珠龙胆石斑鱼低温暂养及模拟运输研究

王田^{1,2}, 黄卉¹, 岑剑伟^{1,4}, 魏涯¹, 郝淑贤¹, 吴燕燕¹, 何静怡^{1,3}, 陈琛^{1,3}

1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业农村部水产品加工重点实验室, 广东 广州 510300;
2. 大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁 大连 116023;
3. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306;
4. 三亚热带水产研究院, 海南省深远海渔业资源高效利用与加工重点实验室, 海南 三亚 572018

摘要: 为构建珍珠龙胆石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂)的运输方法, 研究了低温暂养及模拟运输操作对珍珠龙胆石斑鱼血清生化指标、肝脏抗氧化指标和肝脏组织结构产生的影响。通过单因素试验确定不同降温速率、暂养温度、盐度、鱼水重量比对珍珠龙胆石斑鱼存活时长的影响, 采用响应面法优化了低温暂养的工艺条件, 基于最优条件对石斑鱼进行模拟运输试验, 测定不同时段的水质指标、血清生化指标和肝脏抗氧化指标, 并通过光学显微镜观察鱼体肝脏微观结构的变化。结果表明, 在降温速率为 1.2 °C/h, 温度为 15.7 °C, 盐度为 24‰, 鱼水重量比为 1 : 5 运输条件下, 珍珠龙胆石斑鱼可存活超过 55 h。随着运输时间的延长, 珍珠龙胆石斑鱼的血清谷丙转氨酶、谷草转氨酶和乳酸脱氢酶活性逐渐增强, 应激反应使得皮质醇含量也快速增加, 肝脏超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性升高, 肝脏组织损伤程度逐渐加深。本研究可为珍珠龙胆石斑鱼及其他海水鱼类的保活运输实践提供技术支撑。

关键词: 珍珠龙胆石斑鱼; 低温模拟运输; 响应面法; 血清生化; 肝脏抗氧化; 肝脏组织结构
中图分类号: S981 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2024)01-0095-11

珍珠龙胆石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂)是暖水性大中型海洋高档名贵鱼类, 具有生长快速和抵抗力强的杂交优势, 因其肉质鲜美、优质蛋白质含量高、脂肪酸中不饱和脂肪酸占比高的特点而深受广大消费者青睐^[1-3]。2022年我国海水养殖总产量 2275.70 万 t, 其中海水鱼类中石斑鱼产量为 20.58 万, 同比增加 0.83%^[4]。活鱼营养价值远高于冻藏鱼, 市场调查显示, 活鱼价格是冷冻冷藏鱼的 2~5 倍^[5]。珍珠龙胆石斑鱼多以鲜销为主, 但因产销地域跨度大, 其鱼鳍常因运输中多种应激影响而损伤, 甚至导致死亡^[6]。因此, 珍珠龙胆石斑鱼在保活运输中关键技术的

优化对于提高其商品价值具有重要意义。鱼类活运中合适的水温和盐度可以延长存活时间和提高运输效率^[7-8], Tan 等^[9]在大黄鱼的保活运输中发现, 低温结合二氧化碳麻醉条件下大黄鱼的运输存活率高且对鱼肉品质影响较小。袁仲瑾等^[3]在珍珠龙胆石斑鱼低温暂养研究中发现, 16 °C 下其非特异性免疫和抗氧化系统调控能力较强, 肝脏的氧化应激损伤减小, 存活时间延长。水体盐度对鱼体渗透压调节、耗氧率、能量收支平衡、饲料消化利用、生长性能、氨氮排泄和存活等多方面产生影响, 过高盐度对体内免疫调节、生长行为等有消极作用。此外, 冷驯是活鱼运输中必不

收稿日期: 2023-11-24; 修订日期: 2023-12-14。

基金项目: 国家特色淡水鱼产业技术体系资助项目(CARS-46); 国家海水鱼产业技术体系项目(CARS-47); 海南省自然科学基金面上项目(321MS099); 广东省现代农业产业技术体系海水鱼产业创新项目(2019KJ143); 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资助项目(2023TD78, 2023TD740)。

作者简介: 王田(1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产品加工与贮藏保鲜. E-mail: wagtia@foxmail.com

通信作者: 岑剑伟, 博士, 研究员, 研究方向为水产品加工与质量安全. E-mail: genvex@163.com

可少的步骤,作为暂养的关键步骤之一,降温速率将直接影响鱼体健康,王彩霞等^[10]在加州鲈无水保活研究中发现,适宜的降温速率对鱼肝脏和肾脏影响最小,能保证鱼的肌肉品质发生较小的变化。本研究通过探究不同模拟运输条件下珍珠龙胆石斑鱼的存活时长、血清生化指标、肝脏抗氧化指标和肝脏结构组织以及水质的变化,以期获得适合珍珠龙胆石斑鱼的低温保活运输工艺,为建立珍珠龙胆石斑鱼的保活流通规范提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验鱼珍珠龙胆石斑鱼在 2021 年 9—12 月采购于广州融渔科技有限公司,从每批购买的实验原料中,挑选活力良好的石斑鱼进行实验,实验共使用 247 尾鱼,体重(550±43) g,体长(21±6) cm,鱼体表完整,无体表伤,鳞片完整。适应期间鱼水重量比为 1:20,水温 23~24 °C,盐度 25‰~26‰,暂养期间使用水循环系统循环过滤海水,空气泵持续供氧,水体溶解氧含量>7 mg/L。

试剂:海水晶(江西盐通科技有限公司);冰乙酸(广州化学试剂厂);无水乙醇、二甲苯、中性树胶(国药集团化学试剂有限公司);皮质醇测定试剂盒(上海酶联生物科技有限公司);Bradford 蛋白浓度、超氧化物歧化酶活性测定试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司);丙二醛检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶检测试剂盒(南京建成生物科技有限公司);HE 染液套装(武汉塞维尔生物科技有限公司)

1.2 仪器与设备

Multi3630 IDS 便携式多参数水质分析仪(德国 WTW 公司);KD-2AS 风冷式冷水机(广州市澳鑫设备科技有限公司);HD-A521 模拟汽车运输振动试验台(东莞市海达仪器有限公司);BS-800M 全自动生化分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);UV2550 紫外可见分光光度计(日本岛津公司);全自动酶标仪(美国 BioTek 公司);3K30 高速台式冷冻离心机(德国 Sigma 公司);SPX 智能

生化培养箱(宁波江南仪器厂);T50 均质机(德国 IKA 公司);HWS-24 电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司);JB-P5 包埋机(武汉俊杰电子有限公司);JB-L5 冻台(武汉俊杰电子有限公司);RM2016 病理切片机(上海徠卡仪器有限公司);Donatello 脱水机(意大利 DIAPATH 公司);KD-P 组织摊片机(金华市科迪仪器有限公司);Giotto 染色机(意大利 DIAPATH 公司);Eclipse Ci-L 正置光学显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 单因素实验 降温速率:利用实验室自制梯度降温及暂养装置(图 1),冷水机分别以 0.5 °C/h、1 °C/h、2 °C/h 和 3 °C/h 匀速降温至 16 °C 及直接降温(30 min 内降至 16 °C),鱼水重量比 1:5,盐度 25‰;温度实验:冷水机以 1 °C/h 降温至 15 °C、16 °C、18 °C、20 °C、24 °C,其余条件同上;盐度实验:盐度分别设为 10‰、15‰、20‰、25‰、30‰、35‰,其余条件同上;鱼水重量比实验:分别在 1:5、1:4、1:3、1:2 下保活,其余条件同上。模拟运输台振动频率 40 r/min,以静态试验组为对照组,分别在不同单因素实验条件下记录鱼的存活时长。

1.3.2 响应面优化试验 利用 Design-Expert12 软件中的 Box-behnken design (BBD)原理设计实验方案。根据单因素试验选取降温速率、温度和盐度作为试验因素,-1、0、1 分别代表各因素的 3 个水平,以存活时时长为评价指标,研究珍珠龙胆石斑鱼保活运输的最佳低温保活运输工艺,试验方案如表 1 所示。

1.3.3 模拟运输试验 珍珠龙胆石斑鱼经梯度降温后转移至模拟运输振动台上(图 1)温度 15.7 °C、盐度 24‰的泡沫箱中,鱼水重量比为 1:5,振动台转速 40 r/min,进行模拟运输试验。以原料鱼为对照组,分别在保活第 0、3、12、24、48 小时随机每个时间点抽取 6 尾样品从草鱼尾部静脉取血,全血不加抗凝剂,37 °C 恒温生化箱中静置 0.5 h,待血液凝固分层后,以 4 °C、4000 r/min 离心 10 min,取血清于-80 °C 保存备用。

1.3.4 水质指标的测定 在保活 0、3、12、24、48 h 时用多参数水质分析仪测定水质电导率、pH,

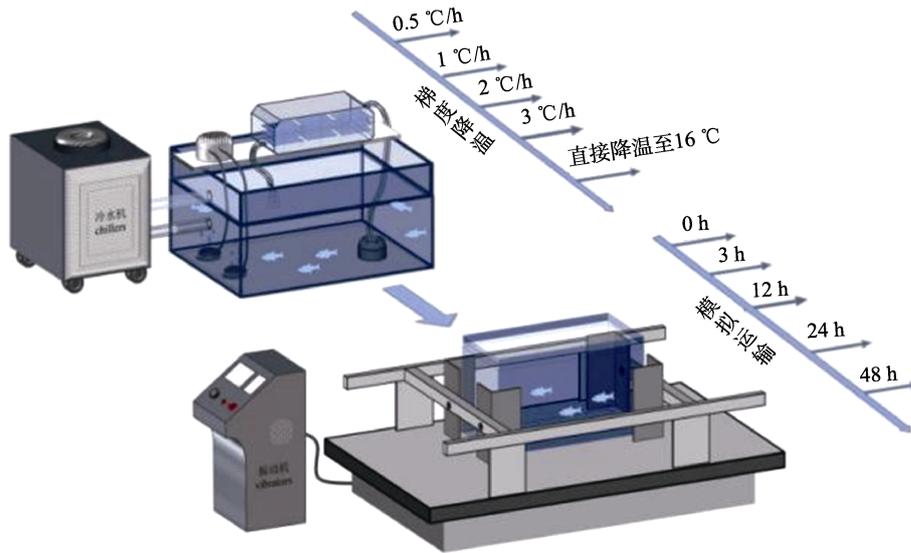


图 1 梯度降温暂养和模拟运输示意图

Fig. 1 Schematic diagram of gradient cooling temporary and simulated transportation

表 1 因素水平编码表
Tab. 1 Factor level coding table

水平 level	因素 factor		
	降温速率/(°C/h) cooling rate	温度/°C temperature	盐度/% salinity
-1	1	15	20
0	1.5	16	25
1	2	17	30

水体中总氮浓度的测定参考金慧等^[11]的方法, 亚硝酸盐浓度的测定按照 HJ/T 197-2005 的方法^[12]。

1.3.5 血清生化指标测定 试验鱼每尾取 500 μL 血清, 全自动生化分析仪测定葡萄糖(GLU)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(AKP)、乳酸脱氢酶(LDH)、白蛋白(ALB)、总蛋白(TP)、总胆固醇(TC)及甘油三酯(TG)。其中, GLU 含量的测定采用己糖激酶法, ALT、AST、AKP、LDH 活性的测定采用速率法, ALT 含量的测定采用溴甲酚绿法, TP 含量的测定采用双缩脲法, TC 采用胆固醇氧化酶法, TG 采用比色法。血清中皮质醇(COR)含量采用酶联免疫法进行检测。

1.3.6 肝脏抗氧化指标测定 每条鱼收集(2.0±0.1) g 肝脏组织并放入 50 mL 离心管中, 加入 0.9%生理盐水 18 mL, 在冰上对组织进行均质, 匀浆在 4 °C 下 3000 r/min, 离心 15 min, 取上清

液保存在-80 °C 下以待分析。肝脏组织中谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)采用试剂盒进行测定, 丙二醛(MAD)采用 TBA 法, 超氧化物歧化酶(SOD)采用 WST 微板法, 过氧化氢酶(CAT)采用钼酸铵法。

1.3.7 肝脏组织样片制备与读片 石斑鱼肝脏组织样本用 4%多聚甲醛溶液固定, 固定的标本在流水下清洗, 乙醇脱水, 用二甲苯透明, 嵌入石蜡并切片(切片厚度 5~6 μm)。切片经 HE 染色、脱水并封装在中性树脂中, 使用光学显微镜对组织结构进行观察拍照。

1.4 数据处理

采用 R 软件(4.3.1 版)的 multcomp view 包进行多重比较, 通过 ggplot2 软件包进行可视化分析, 结果以平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示, 组间差异通过单因素方差(one-way ANOVA)结合邓肯检验法进行比较分析, $P < 0.05$ 认为差异显著。

2 结果与分析

2.1 各单因素对珍珠龙胆石斑鱼存活时间的影响

在静态和动态运输条件下, 各因素对珍珠龙胆石斑鱼的存活时间影响的趋势基本一致, 由图 2 所示, 鱼体存活时间随温度升高呈先上升后下降的趋势, 16 °C 下存活时间最长; 低盐度和高盐度都不利于珍珠龙胆石斑鱼存活, 在 20‰~25‰ 盐度的水体中存活时间最长; 比较降温速率发现,

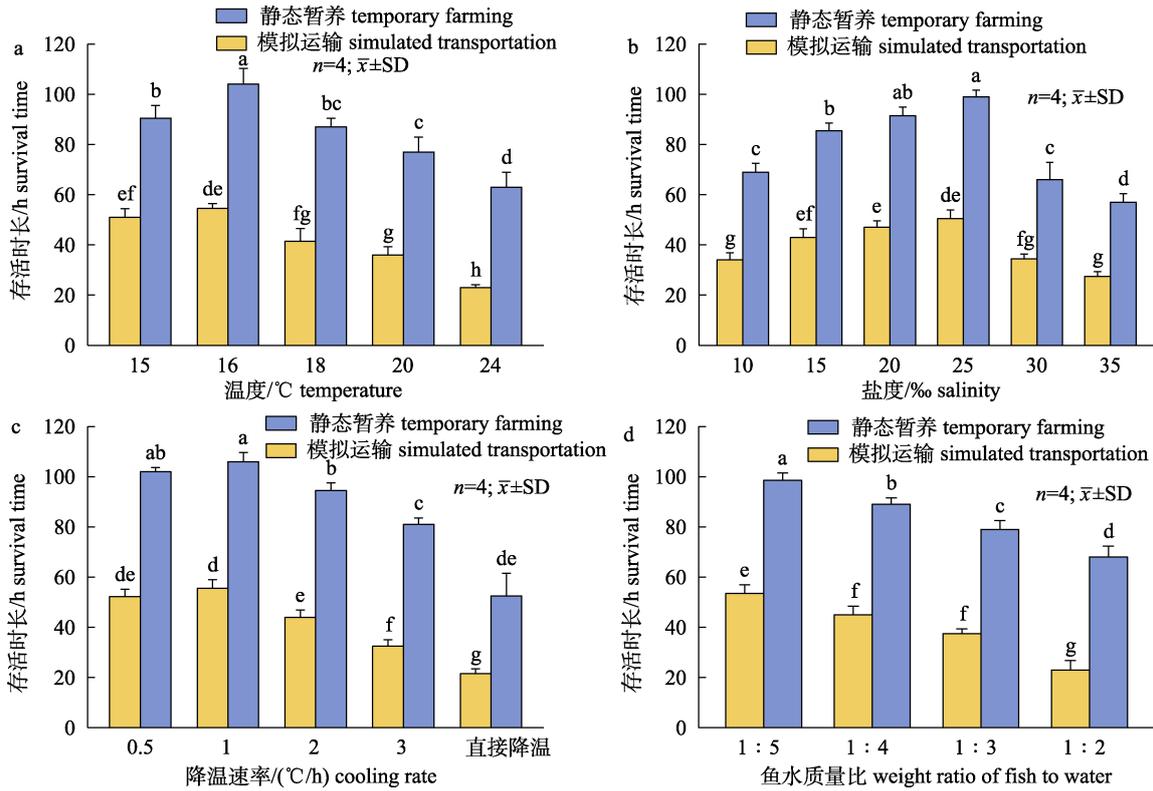


图 2 温度(a)、盐度(b)、降温速率(c)和鱼水重量比(d)对珍珠龙胆石斑鱼存活时间的影响
不同字母表示组间存在显著性差异(P<0.05).

Fig. 2 Effects of temperature (a), salinity (b), cooling rate (c), and weight ratio of fish to water (d) on the survival time of grouper
Different letters indicate significant differences between groups (P<0.05).

采用直接降温方式的石斑鱼的存活时间最短, 0.5、1 °C/h 降温速率下的鱼体存活时间最长, 降温速率加快, 存活时间显著减低; 鱼体的存活时间随鱼水重量比增大显著下降, 鱼水重量比为 1 : 5 时, 静态暂养和模拟运输中石斑鱼的存活时间最长。通过单因素实验可知, 温度在 15~18 °C, 盐度 15~25‰, 降温速率在 1.0~2.0 °C/h, 鱼水重量比越小越有利于延长活鱼运输时长, 但降低鱼水重量比必然会增加运输成本。

2.2 响应面试验结果与分析

2.2.1 响应面试验结果 根据以上单因素试验结果, 以降温速率(A)、温度(B)、盐度(C)为自变量, 以鱼体存活时间为响应值, 采用 Box-Behnken 试验设计, 其结果如表 2 所示。

以珍珠龙胆石斑鱼的存活时间(Y)为响应值, 回归模型方程: $Y=53-3.63A-1.62B-6.5C+0.5AB+0.75AC+0.25BC-3.75A^2-3.75B^2-11.5C^2$ 。

表 2 Box-Behnken 试验设计及结果
Tab. 2 Experimental design and results of Box-Behnken
n=3; $\bar{x}\pm SD$

试验号 test number	降温速率/(°C/h) cooling rate	温度/°C temperature	盐度/‰ salinity	存活时间/h survival time
1	1	15	25	52
2	2	15	25	43
3	1	17	25	47
4	2	17	25	40
5	1	16	20	48
6	2	16	20	40
7	1	16	30	34
8	2	16	30	29
9	1.5	15	20	46
10	1.5	17	20	43
11	1.5	15	30	32
12	1.5	17	30	30
13	1.5	16	25	53
14	1.5	16	25	54
15	1.5	16	25	51
16	1.5	16	25	54
17	1.5	16	25	53

由表 3 可知, 模型的 F 值为 106.15, 极显著 ($P<0.001$), 失拟项为 0.6426, 不显著 ($P>0.05$), $R^2=0.9927$, $R^2_{adj}=0.9834$, 表明回归方程能够准确地拟合降温速率、温度、盐度对珍珠龙胆石斑鱼存活时间的影响, 可用来分析预测珍珠龙胆石斑鱼的低温保活运输工艺。 A 、 C 、 A^2 、 B^2 、 C^2 值具

有极显著性($P<0.001$)。由 F 值可知三因素的影响顺序依次为: $A=C>B$, 降温速率和盐度对存活时间的影响较大, 温度对存活时间的影响较小。

2.2.2 各因素交互作用的响应面分析 图 3 是 3 个因素交互作用的影响, 降温速率、温度和盐度之间的交互作用均不显著($P>0.05$)。温度侧的响应

表 3 响应面模型方差分析

Tab. 3 ANOVA for response surface model

方差来源 source	平方和 sum of squares	自由度 df	均方 mean square	F	P	显著性 significance
模型 model	1194.19	9	132.69	106.15	<0.0001	***
A	105.13	1	105.13	84.10	<0.0001	***
B	21.13	1	21.13	16.90	0.0045	**
C	338.00	1	338.00	270.40	<0.0001	***
AB	1.00	1	1.00	0.80	0.4008	
AC	2.25	1	2.25	1.80	0.2216	
BC	0.25	1	0.25	0.20	0.6682	
A^2	59.21	1	59.21	47.37	0.0002	***
B^2	59.21	1	59.21	47.37	0.0002	***
C^2	556.84	1	556.84	445.47	<0.0001	***
残差 residual	8.75	7	1.25			
失拟项 lack of fit	2.75	3	0.92	0.61	0.6426	
纯误差 pure error	6.00	4	1.50			
总变异 cor total	1202.94	16				

注: 表示极显著($P<0.001$); **表示较显著($P<0.01$); *表示显著($P<0.05$)。

Note: *** indicates extremely significant ($P<0.001$); ** indicates more significant ($P<0.01$); * indicates significant ($P<0.05$).

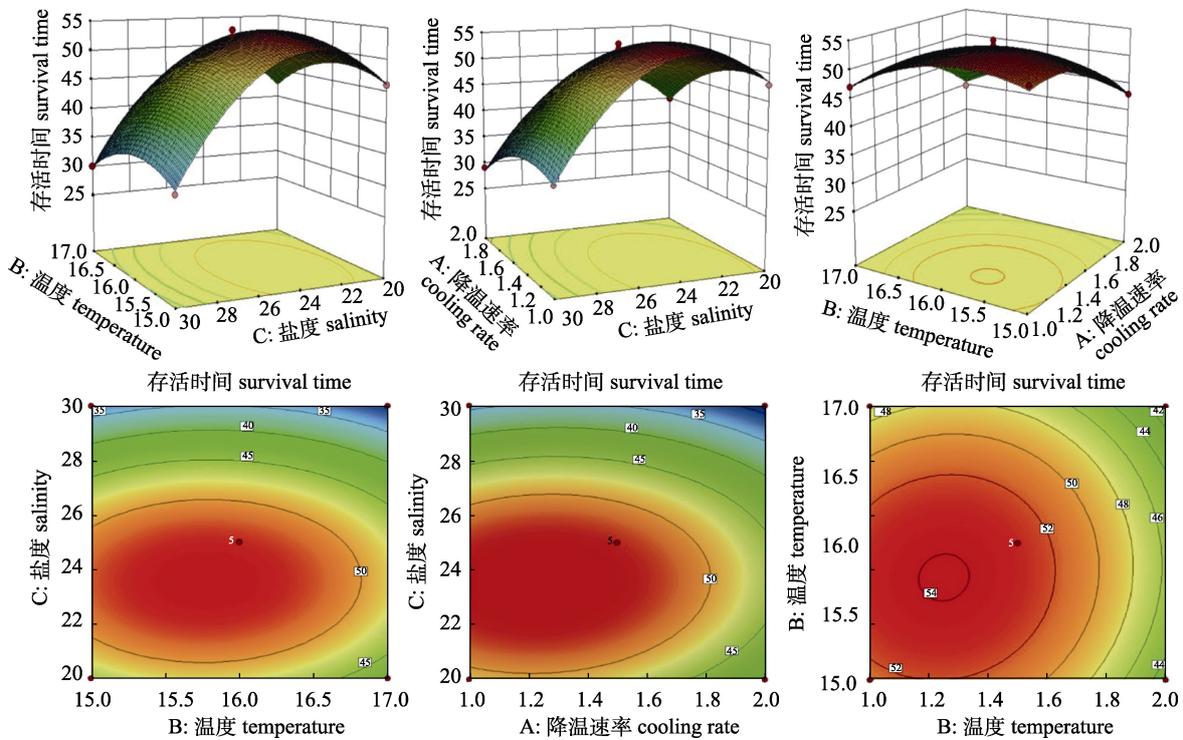


图 3 各因素交互作用对石斑鱼存活时间影响的响应面图

Fig. 3 Response surface plots of the effect of the interaction of factors on survival time of grouper

面较盐度侧更缓,说明温度对石斑鱼存活时间的影响弱于盐度。降温速率侧的响应面较陡,说明降温速率对石斑鱼存活时间的影响较显著。因此,温度对石斑鱼存活时间的影响最小,这与前面的方差分析结果保持一致。等高线的形状可以反映交互作用的显著性,等高线呈椭圆形表示两因素交互作用显著。

2.2.3 最优模型验证 采用 Design-Expert 12 软件分析得到的珍珠龙胆石斑鱼低温保活运输最佳工艺为:降温速率为 1.234 °C/h、温度 15.738 °C、盐度 23.483%,理论存活 55.16 h。结合实验可操作性,将降温速率设定为 1.2 °C/h,温度设定为 15.7 °C,盐度设定为 24%。在 1:5 鱼水重量比下进行模拟运输实验,珍珠龙胆石斑鱼的存活时间为(55.6±1.7) h,与理论结果比较相近,表明此响应面模型优化得到的珍珠龙胆石斑鱼低温保活运输工艺可靠。

2.3 模拟运输过程中水质指标的变化

水质是保活运输中的关键因素,由图 4 可知,

水体中总氨氮、亚硝酸盐浓度及电导率在运输过程中有大幅度上升趋势,pH 虽有波动,但总体呈上升趋势。运输 0~24 h 内水体中总氨氮浓度增速与 24~48 h 相比较为缓慢,而亚硝酸盐浓度在 0~24 h 内迅速上升,24 h 后迅速下降。水体的电导率随运输时间的延长呈缓慢增加的趋势。在运输过程中水体 pH 呈上升趋势,但其范围仍控制在 6.5~8.5 之间。

2.4 模拟运输过程中珍珠龙胆石斑鱼血清生化指标和肝脏氧化应激指标的变化

珍珠龙胆石斑鱼在运输过程中受到多种因素的影响产生应激反应,通过各项血液生化指标可评估鱼体受到的应激程度大小。如图 5 所示,COR、GLU、ALT、AST、AKP 和 LDH 活性总体上随运输时间延长呈先上升后下降趋势,各生化指标在运输 3 h 后显著上升,其中 AST 和 ALT 变化趋势一致。运输 48 h 后 TG 和 TC 含量显著下调,而 ALB 和 TP 含量先上升后下降。珍珠龙胆石斑鱼在受到急性低温胁迫后,SOD、CAT、GPX

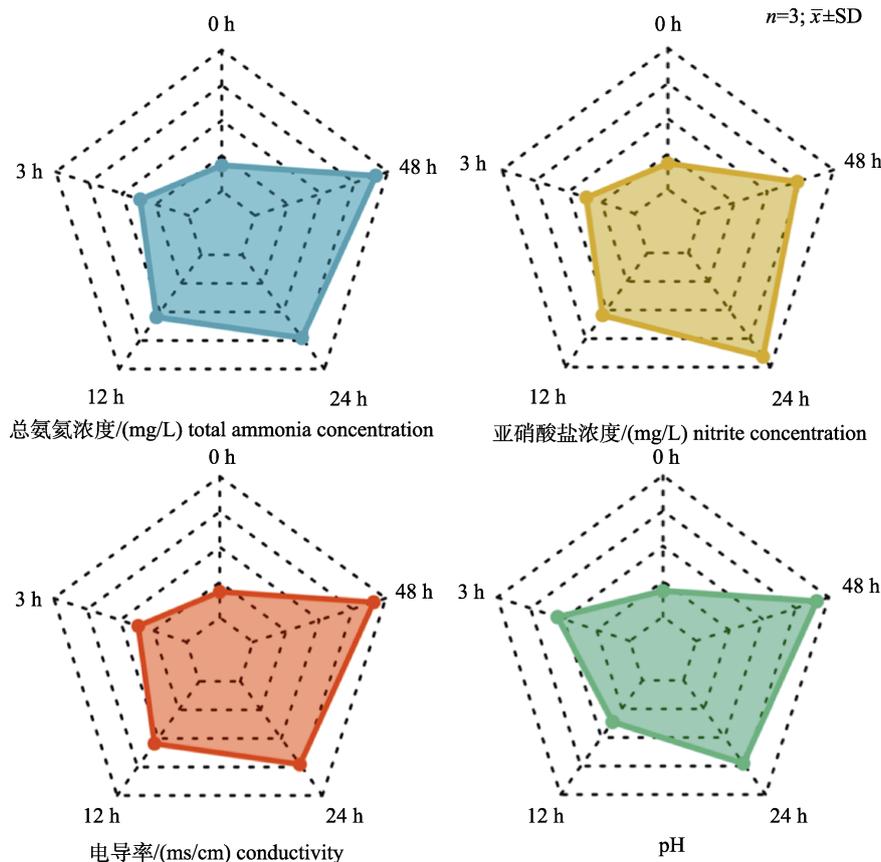


图 4 水质指标随运输时间的变化

Fig. 4 Variation of water quality indicators with transportation time

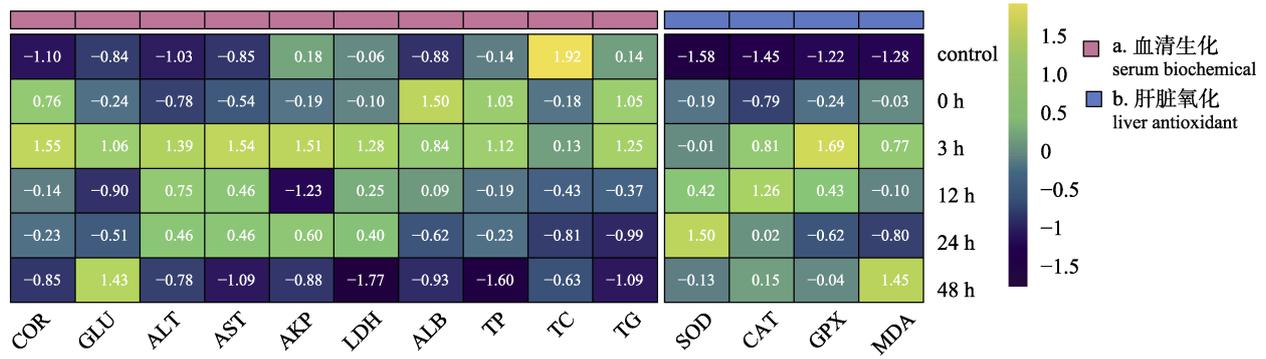


图 5 珍珠龙胆石斑鱼血清生化指标和肝脏氧化应激指标在不同运输时间的热图分析

Fig. 5 Heat map analysis of serum biochemical indexes and liver antioxidant stress indicators in grouper across different transportation times

活性及 MDA 含量均上调, 在 3~48 h 运输过程中, SOD、CAT 和 GPX 活性随时间呈先上升后下降的趋势, 而 MDA 含量呈先上升后下降再上升的趋势。

2.5 模拟运输过程中珍珠龙胆石斑鱼肝脏组织结构的变化

对珍珠龙胆石斑鱼的肝脏组织结构进行观察, 如图 6 所示, 对照组鱼的肝脏结构清晰, 肝细胞排列紧密, 少量肝细胞胞浆可见圆形空泡, 静脉内皮完整正常, 组织未见明显坏死或炎症反应。随着运输时间的延长, 肝脏表现出不同程度和形式的损伤, 与对照组相比, 开始降温后较多肝细胞胞浆有圆形空泡, 未见其他明显现象; 运输 3 h 后, 肝细胞肿胀, 胞浆空白; 运输 12 h 后, 广泛见肝细胞肿胀, 胞浆稀疏, 并且在少量静脉周围可以看到炎性细胞灶性浸润; 运输 24 h 后, 细胞核失去了原有形态, 细胞排列松散不规则, 空泡消失; 运输 48 h 后, 肝细胞胞浆内含数量不等的圆形空泡, 较多静脉周围肝细胞坏死, 胞核溶解, 胞浆浓缩, 呈嗜酸性均质样, 并且伴少量结缔组织增生。

3 讨论

3.1 模拟运输对水质指标的影响

在保活运输过程中, 水质直接影响鱼的存活时间和运输效果。足够的氧气、适宜的温度、稳定的 pH 和氨氮含量等都是确保鱼类存活和运输效果的关键。本研究中, 亚硝酸盐浓度呈先上升后下降的趋势, 原因可能是硝化细菌在运输前期

占据主导地位, 氨氮被快速分解为亚硝酸盐等物质, 而在运输 24 h 后, 由于珍珠龙胆石斑鱼排放的含氮有机物在水中大量积累, 导致反硝化细菌等迅速繁殖, 造成水体中总氨氮含量迅速上升^[13]。水中电导率可以帮助监测水体中的溶解物质含量, 高电导率可能意味着水体中的盐度或溶解氧含量超过了鱼类所能耐受的范围。在整个运输过程中, 水体的电导率呈缓慢增加的趋势, 可能是由于珍珠龙胆石斑鱼在存活过程中会产生代谢产物, 这些产物会导致水中盐分浓度增加, 从而影响电导率升高, 这与朱乾峰等^[14]研究珍珠龙胆石斑鱼低温有水保活的结果相似。运输过程中 pH 维持在 6.5~8.5, 不会对鱼体造成较大程度的损伤^[15], 因此该条件下水质 pH 的变化对石斑鱼存活时间影响不大。

3.2 模拟运输对珍珠龙胆石斑鱼应激反应的影响

COR 是在鱼类生理应激反应过程中产生的皮质类固醇激素, 血液中皮质醇浓度可以作为衡量鱼应激强度的指标^[16]。有研究发现 COR 的分泌能够促进鱼体内的蛋白质和糖原合成, 同时加速脂肪降解, 释放出氨基酸、葡萄糖和脂肪酸, 从而提供机体所需的能量^[17]。这种适应性生理反应可以帮助鱼类适应外界环境胁迫, 并减缓应激反应带来的负面影响, 例如免疫抑制、生长退化及存活率下降等。同时, 环境温度、盐度和酸碱度等因素会显著影响 COR 的分泌和生理作用。鱼类在出现应激反应时, 短期内会出现“高血糖”症状, 为维持体内的 GLU 平衡, 需通过糖异生作用提高

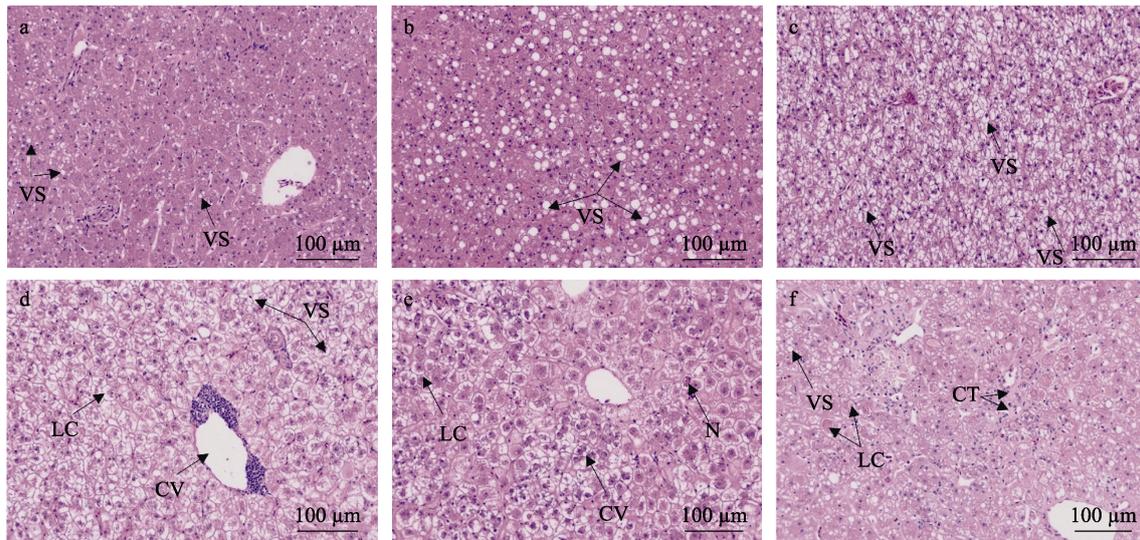


图 6 运输过程中珍珠龙胆石斑鱼肝脏组织结构的变化

a. 对照组; b. 0 h 组; c. 3 h 组; d. 12 h 组; e. 24 h 组; f. 48 h 组. VS: 空泡; LC: 肝细胞; CV: 静脉; N: 细胞核; CT: 结缔组织.

Fig. 6 Changes in liver tissue structure of grouper during transportation

a. Control group; b. 0 h group; c. 3 h group; d. 12 h group; e. 24 h group; f. 48 h group. VS: vacuole;

LC: hepatocyte; CV: vein; N: nucleus; CT: connective tissue.

体内的 GLU 水平^[18]。GLU 含量的升高主要是由儿茶酚胺和皮质醇分别激活肝脏糖异生和肌肉组织分解糖原引起, COR 的分泌促进糖原的生成, 从而使其血液中 GLU 水平升高^[19]。本研究中珍珠龙胆石斑鱼在经历急性降温后, COR 和 GLU 含量显著上调, 说明急性降温和环境胁迫使鱼体产生应激反应, 为适应外界的变化, 鱼体内部大量糖原被分解为葡萄糖, 以维持体内环境平衡^[20], 这与 Pilinkovskij 等^[21]对大西洋鲟在运输胁迫研究中血糖变化结果相似。正常情况下, 鱼体血清中的 ALT 和 AST 活性较低且稳定, 但是当肝脏、心脏等器官受到损伤或者发生病变时, 这两种酶就会从细胞内渗出进入血液, 从而使血液中的 ALT 和 AST 含量显著升高^[22-23]。与对照组相比, ALT 和 AST 含量在运输 3 h 后达到最高值, 原因可能是珍珠龙胆石斑鱼受到振动刺激后, 为了稳定内环境的平衡启动代谢补偿机制, 同时应激反应对鱼体的肝脏等组织器官造成了一定的损伤^[24], 这与 Hoseini 等^[25]对鲤用姜黄缓解运输应激的研究结果相似。TG 和 TC 是鱼体内主要能量来源和细胞膜的重要组成部分^[26], 运输 48 h 后 TG 和 TC 含量显著下调, 表明鱼体的肝脏有所损伤, 石斑鱼自身脂类等能量物质被分解, 同时肝脏组织损伤严

重, 阻碍了甘油三酯通过肠肝循环途径再吸收到肝脏^[27]。而 ALB 和 TP 含量先上调后下调则表明在低温应激下鱼体形成保护蛋白, 而长时间运输之后, 鱼体受到持续应激, 造成不可逆性损伤, 蛋白合成减少^[28]。

3.3 模拟运输对珍珠龙胆石斑鱼抗氧化能力的影响

SOD 主要是清除细胞中生成的超氧自由基 ($O_2^{\cdot-}$); CAT 主要清除过氧化氢 (H_2O_2); GPX 主要清除细胞内外的过氧化脂质和有机过氧化物^[29-31], MDA 是由于脂质过氧化反应而生成的产物, 其含量的高低可以反映细胞膜的氧化损伤情况。因此, 评估 SOD、CAT、GPX 和 MDA 的含量及活性可以较全面地反映机体氧化损伤程度。本研究中珍珠龙胆石斑鱼在受到急性低温胁迫后, SOD、CAT、GPX 活性及 MDA 含量均上调, 说明石斑鱼受到应激后鱼体内部产生了大量活性氧自由基, 需要较多的 SOD、CAT、GPX 酶活来清除体内过多的自由基。MDA 含量呈先上升后下降再上升的趋势, 原因可能是在 24 h 以内, 鱼体在低温、饥饿和运输胁迫的影响下, 肝脏中 SOD、CAT 和 GPX 活性增强以抵抗氧化应激, 因此 MDA 含量迅速下降, 但随着运输时间的延长, 水体中氨氮、

亚硝酸盐等有毒物质大量富集, 使鱼体中毒导致抗氧化功能受损, 体内活性氧自由基无法被及时清除, 组织氧化损伤导致 MDA 含量的迅速增加^[32-33]。肝脏 MDA 含量在运输 48 h 后明显高于对照组, 说明鱼体在运输过程中, 肝脏氧化损伤程度不断加重, 使细胞脂质过氧化反应加剧致 MDA 大量生成。

3.4 模拟运输对珍珠龙胆石斑鱼肝脏组织结构的影响

肝脏是鱼体内重要的器官, 具有能量代谢和脂肪酸供应等多种功能, 利用能量可以对细胞进行修复和再生^[34]。对照组的珍珠龙胆石斑鱼肝脏组织结构清晰, 其中有少量的空泡, 可能是鱼体需要能量, 脂质分解为葡萄糖进行供能, 导致了空泡的存在。经过降温后, 圆形空泡增多, 原因可能是珍珠龙胆石斑鱼在应激反应下的能量供应主要来自肝糖原或者脂肪的分解^[35]。运输 24 h 时, 细胞核形态发生变化, 表明肝脏组织受损, 同时肝细胞中的能量物质被氧化分解。在长时间运输下, 肝脏的自我调节能力逐渐减弱, 导致细胞核溶解, 肝细胞坏死, 此结果与区又君等^[36]研究低温胁迫对四指马鲛幼鱼肝脏的损伤结果相似; 表明低温运输使珍珠龙胆石斑鱼的肝脏受到损伤, 并随着运输时间的延长而加深。

4 结论

本研究通过单因素结合响应面试验优化了珍珠龙胆石斑鱼的低温保活运输工艺, 最优运输条件为降温速率为 1.2 °C/h, 温度为 15.7 °C, 盐度为 24‰, 鱼水重量比为 1 : 5, 此条件下珍珠龙胆石斑鱼在模拟运输的过程中存活时间最长, 可达 (55.6±1.7) h。血清 COR 含量在运输过程中呈先上调后下调的趋势, 说明石斑鱼在运输过程中逐渐适应环境的变化。运输 3 h 时, ALT、AST、LDH 活性和 COR 含量均达到最大值, 并且鱼体出现了典型的高血糖现象, 说明鱼体在此时的应激反应最为强烈, 能量代谢显著增加。同时, 剧烈的应激反应导致鱼体代谢废物的排放量增大, 水体中氨氮、亚硝酸盐等有毒物质快速积累, 为了抵御外界不利因素造成的氧化损伤, 鱼体激活抗氧化酶

(SOD、CAT、GPX)活性以清除体内的活性氧自由基。运输 48 h 时, 水体中过量的氨氮、亚硝酸盐等物质破坏鱼体内部肝脏、肾脏等组织器官, 肝脏无法维持正常的代谢功能和抗氧化功能, 抗氧化酶(SOD、CAT、GPX)活性显著下降, 脂质过氧化的最终产物 MDA 显著上调。同时, 为了维持机体生命活动所需能量, 石斑鱼自身糖原、脂肪等营养物质被大量分解, 造成大量肝细胞出现空泡, 血清中 TP、TG、TC 含量显著下降。

参考文献:

- [1] Liao C Y, Gao W H, Li J H, et al. Effects of short-term high-fat stress on growth performance, liver health and lipid metabolism genes in *Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2023, 30(9): 1080-1092. (2023-10-18)[2023-11-21]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3446.S.20231017.1002.002.html>. [廖春燕, 高文浩, 李嘉辉, 等. 短期高脂应激对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长性能、肝脏健康和脂代谢基因的影响[J]. 中国水产科学, 2023, 30(9): 1080-1092.]
- [2] Liu L L, Luo M, Chen F X, et al. Influence of salinity on osmoregulation and oxygen consumption rate in juvenile hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *Epinephelus fuscoguttatus* ♀)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2020, 27(6): 692-700. [刘龙龙, 罗鸣, 陈傅晓, 等. 盐度对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼渗透调节与耗氧率的影响[J]. 中国水产科学, 2020, 27(6): 692-700.]
- [3] Yuan Z J, Cen J W, Li L H, et al. Effect of low-temperature acclimation on survival, non-specific immune and antioxidant indexes of *Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂[J]. South China Fisheries Science, 2022, 18(6): 118-126. [袁仲瑾, 岑剑伟, 李来好, 等. 低温暂养对珍珠龙胆石斑鱼存活、非特异性免疫及抗氧化指标的影响[J]. 南方水产科学, 2022, 18(6): 118-126.]
- [4] Ministry of Agriculture and Rural Fisheries Administration, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. 2022 China fisheries statistical year-book[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2022: 22. [农业部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2022 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2022: 22.]
- [5] Zhang Y J, Wang W S, Yan L, et al. Development and evaluation of an intelligent traceability system for waterless live fish transportation[J]. Food Control, 2019, 95: 283-297.
- [6] Fang D, Mei J, Xie J, et al. The effects of transport stress (temperature and vibration) on blood biochemical parameters, oxidative stress, and gill histomorphology of pearl gentian groupers[J]. Fishes, 2023, 8(4): Article No. 218.
- [7] Pinto D, Pellegrin L, Nitz L F, et al. Haematological and oxidative stress responses in *Piaractus mesopotamicus* under temperature variations in water[J]. Aquaculture Research, 2019, 50(10): 3017-3027.
- [8] Bu X Y, Zhu J H, Liu S B, et al. Growth, osmotic response and transcriptome response of the euryhaline teleost, *Oreochromis mossambicus* fed different myo-inositol levels under long-term salinity stress[J]. Aquaculture, 2021, 534: Article No.736294.

- [9] Tan N F, Gao Y P, Wang Y K, et al. The influence of hypothermia hibernation combined with CO₂ anesthesia on life and storage quality of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[J]. *Foods*, 2022, 11(4): Article No.514.
- [10] Wang C X, Bai C, Li N, et al. Comparison of dormancy at different cooling rates on the survival of *Micropterus salmoides* without water[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2020, 36(5): 129-137, 41. [王彩霞, 白婵, 李宁, 等. 不同降温速率休眠的加州鲈无水保活品质比较[J]. *现代食品科技*, 2020, 36(5): 129-137, 41.]
- [11] Jin H, Zhao C, Wei L T, et al. Determination of ammonia nitrogen in fishery water quality by gas phase molecular absorption spectrometry[J]. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2021, 11(4): 23-30. [金慧, 赵城, 魏琳婷, 等. 气相分子吸收光谱法测定渔业水质中氨氮含量方法的建立[J]. *中国渔业质量与标准*, 2021, 11(4): 23-30.]
- [12] State Environmental Protection Administration. Water quality-determination of nitrite-nitrogen gas-phase molecular absorption spectrometry: HJ/T 197-2005[S]. Beijing: Standards Press of China, 2005. [国家环境保护总局. 水质 亚硝酸盐氮的测定 气相分子吸收光谱法: HJ/T 197-2005[S]. 北京: 中国标准出版社, 2005.]
- [13] Huang F, Pan L Q, He Z Y, et al. Culturable heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterial consortia with cooperative interactions for removing ammonia and nitrite nitrogen in mariculture effluents[J]. *Aquaculture*, 2020, 523: 735211.
- [14] Zhu Q F, Chen P W, Fan X P, et al. Optimization of low temperature water conservation for ♀ *Epinephelus fuscoguttatus* × ♂ *Epinephelus lanceolatus*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(22): 276-282. [朱乾峰, 陈鹏文, 范秀萍, 等. 珍珠龙胆石斑鱼低温有水保活条件优化[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(22): 276-282.]
- [15] Erikson U, Rosten C, Klebert P, et al. Live transport of Atlantic salmon in open and closed systems: Water quality, stress and recovery[J]. *Aquaculture Research*, 2022, 53(11): 3913-3926.
- [16] Bortoletti M, Maccatrozzo L, Radaelli G, et al. Muscle cortisol levels, expression of glucocorticoid receptor and oxidative stress markers in the teleost fish *Argyrosomus regius* exposed to transport stress[J]. *Animals*, 2021, 11(4): Article No.1160.
- [17] Pickering A D. Environmental stress and the survival of brown trout, *Salmo trutta*[J]. *Freshwater Biology*, 1989, 21(1): 47-55.
- [18] Yuan Y Y, Cen J W, Li L H, et al. Effect of carbon dioxide anesthesia on physiology and quality of tilapia[J]. *South China Fisheries Science*, 2022, 18(4): 147-155. [袁圆玥, 岑剑伟, 李来好, 等. 二氧化碳麻醉对罗非鱼生理及品质的影响[J]. *南方水产科学*, 2022, 18(4): 147-155.]
- [19] Lawrence M J, Eliason E J, Zoldero A J, et al. Cortisol modulates metabolism and energy mobilization in wild-caught pumpkinseed (*Lepomis gibbosus*)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2019, 45(6): 1813-1828.
- [20] Yuan Y Y, Cen J W, Li L H, et al. Research progress on stress response observation techniques of live fish: A review[J]. *Fisheries Science*, 2023, 42(2): 331-338. [袁圆玥, 岑剑伟, 李来好, 等. 活鱼应激反应观测技术的研究进展[J]. *水产科学*, 2023, 42(2): 331-338.]
- [21] Pilinkovskij A, Vosylienė M Z, Kazlauskienė N, et al. Hematological effects of transportation stress on Atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus* Mitchill L. 1815[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2017, 33(5): 1021-1023.
- [22] Wang W S, Zhang Y J, Liu Y, et al. Effects of waterless live transportation on survivability, physiological responses and flesh quality in Chinese farmed sturgeon (*Acipenser schrenckii*)[J]. *Aquaculture*, 2020, 518: Article No.734834.
- [23] Hong J W, Chen X, Liu S X, et al. Impact of fish density on water quality and physiological response of golden pompano (*Trachinotus ovatus*) flingerlings during transportation[J]. *Aquaculture*, 2019, 507: 260-265.
- [24] Vergauwen L, Benoot D, Blust R, et al. Long-term warm or cold acclimation elicits a specific transcriptional response and affects energy metabolism in zebrafish[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2010, 157(2): 149-157.
- [25] Hoseini S M, Gupta S K, Yousefi M, et al. Mitigation of transportation stress in common carp, *Cyprinus carpio*, by dietary administration of turmeric[J]. *Aquaculture*, 2022, 546: Article No.737380.
- [26] Pribadi T D K, Syahidah D, Harjanti S D, et al. Alteration of gills and liver histological structure of *Cyprinus carpio* L. exposed to leachate[J]. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 2017, 9(2): 289-297.
- [27] Refaey M M, Li D P. Transport stress changes blood biochemistry, antioxidant defense system, and hepatic HSPs mRNA expressions of channel catfish *Ictalurus punctatus*[J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: Article No.1628.
- [28] Harmon T S. Methods for reducing stressors and maintaining water quality associated with live fish transport in tanks: A review of the basics[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2009, 1(1): 58-66.
- [29] Callewaert L, Michiels C W. Lysozymes in the animal kingdom[J]. *Journal of Biosciences*, 2010, 35(1): 127-160.
- [30] Martínez-Álvarez R M, Morales A E, Sanz A. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors[J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2005, 15(1-2): 75-88.
- [31] Li H T, Xu W, Zhao Z G, et al. Effects of alkalinity acclimation on blood physiology and biochemistry and liver antioxidant system of juvenile *Luciobarbus capito*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(4): 12-21. [李海涛, 徐伟, 赵志刚, 等. 碱度驯化对大鳞鲂幼鱼血液生理生化及肝脏抗氧化系统的影响[J]. *渔业科学进展*, 2022, 43(4): 12-21.]
- [32] Doyottea A, Cossu C, Jacquina M C, et al. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*[J]. *Aquatic Toxicology*, 1997, 39(2): 93-110.
- [33] He J Y, Wei Y, Cen J W, et al. Research progress of key technologies for long-distance transportation of live fish and multi-omics technologies in transportation stress assessment[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2023, 49(16): 305-313. [何静怡, 魏涯, 岑剑伟, 等. 活鱼长途运输关键技术及多组学技术在运输应激评价的研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(16): 305-313.]
- [34] Wang Y Y, Ni J J, Nie Z J, et al. Effects of stocking density on growth, serum parameters, antioxidant status, liver and intestine histology and gene expression of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) farmed in the in-pond raceway system[J]. *Aquaculture Research*, 2020, 51(12): 5228-5240.
- [35] Ghelichpour M, Mirghaed A T, Mirzargar S S, et al. Plasma proteins, hepatic enzymes, thyroid hormones and liver histopathology of *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) exposed

to an oxadiazin pesticide, indoxacarb[J]. *Aquaculture Research*, 2017, 48(11): 5666-5676.

[36] Ou Y J, Liu Q Q, Wen J F, et al. The effects of acute low temperature stress on liver, muscle and gill tissues of juvenile

Eleutheronema tetradactylum[J]. *Ecological Science*, 2018, 37(5): 53-59. [区又君, 刘奇奇, 温久福, 等. 急性低温胁迫对四指马鲛幼鱼肝脏、肌肉以及鳃组织结构的影响[J]. *生态科学*, 2018, 37(5): 53-59.]

Research on cool acclimation and simulated transportation of pearl gentian grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂)

WANG Tian^{1,2}, HUANG Hui¹, CEN Jianwei^{1,4}, WEI Ya¹, HAO Shuxian¹, WU Yanyan¹, HE Jingyi^{1,3}, CHEN Chen^{1,3}

1. Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;
3. College of Food Science & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
4. Key Laboratory of Efficient Utilization and Processing of Marine Fishery Resources of Hainan Province; Sanya Tropical Fisheries Research Institute, Sanya 572018, China

Abstract: Pearl gentian grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂) was studied to explore the cool acclimation process and evaluate its transport stress response through a series of biochemical indices. The effects of different cooling rates, water temperature, salinity, and fish-water ratios on the survival time of the pearl gentian grouper were determined. Response surface methodology was used to optimize the cool acclimation conditions, and a simulated transportation test was carried out on the pearl gentian grouper based on optimal conditions to determine the water quality indicators, serum biochemical indices, and liver antioxidant indicators at different time points; changes in the liver microstructures of the pearl gentian grouper were observed using an optical microscope. The optimal conditions for the acclimation process of pearl gentian grouper were obtained as follows: cooling rate of 1.2 °C/h, temperature of 15.7 °C, salinity of 24‰, and weight ratio of fish to water of 1 : 5. Under these conditions the fish could survive for (55.6±1.7) h. In the simulated transportation, as the operation time increased, the total ammonia nitrogen concentration, nitrite concentration, and conductivity of the water increased rapidly. Transportation operation induced a gradual increase in serum alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, and lactate dehydrogenase activities and a rapid increase in cortisol levels, and their content returned to normal after 48 h. Serum albumin, total protein, triglyceride and total cholesterol contents decreased significantly at 48 h, indicating that transportation stress led to the decomposition of proteins and lipids in the serum, which affected the composition and content of the serum. The activities of liver superoxide dismutase, hydrogen peroxidase, and glutathione peroxidase were elevated during transportation as a pathway to counteract the oxidative stress of the organism. However, with the prolongation of transportation time, the organism gradually depleted and reduced the production of these enzymes, and the enzyme activities showed reduced trends at 48 h. Optical microscopy revealed that adverse effects on the liver tissue of pearl gentian grouper gradually increased. After 24 h, the arrangement of liver cells became chaotic and the overall morphology of the liver was lost. The study showed that the optimized cool temperature acclimation conditions were suitable for the pearl gentian grouper in simulated transportation, and different stages of transportation exhibited varying changes in water quality indicators, serum biochemical indicators, liver antioxidant indicators, and microstructure. These results provide technical support for the preservation and transportation of pearl gentian grouper and other marine fish.

Key words: *Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂; temporary cool simulated transport; response surface methodology; serum biochemistry; liver antioxidant; hepatic histology

Corresponding author: CEN Jianwei. E-mail: genvex@163.com