

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17048

高温和低氧胁迫对两种规格刺参半致死时间及生理机能的影响

周晓梦¹, 张秀梅^{1,2}, 李文涛¹

1. 中国海洋大学, 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 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

摘要: 通过实验生态学方法, 针对2种规格的刺参(*Apostichopus japonicus*) (大: 28.00~36.00 g; 小: 9.00~13.00 g), 测定温度为(25.0±0.5)°C溶解氧(DO)水平为(1.0±0.1) mg/L条件下刺参的半致死时间(LT₅₀); 比较分析了DO水平分别为(1.0±0.1) mg/L、(3.0±0.1) mg/L及6.5 mg/L(正常DO含量)条件下2种规格刺参的昼夜代谢水平; 监测了DO水平分别为(1.0±0.1) mg/L和(3.0±0.1) mg/L时低氧胁迫24 h及复氧72 h期间, 2种规格刺参体腔液和呼吸树中的谷胱甘肽(GSH)含量、总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性及体腔液中皮质醇水平的变化, 以探究夏季高温期(25.0±0.5)°C低氧胁迫对不同规格刺参半致死时间及生理机能的影响。结果显示: 当DO浓度为1 mg/L时, 大规格刺参半致死时间(LT₅₀)为33.37 h, 小规格刺参为28.84 h, 2种规格刺参的代谢水平显著低于常氧对照组, 夜间代谢强度高于白天, 且小规格刺参的代谢强度高于大规格刺参。1 mg/L低氧胁迫期间, 大规格刺参体腔液及2种规格刺参呼吸树中上述4种抗氧化指标的变化趋势大致相同, 与对照组相比, 随着低氧暴露时间的延长, GSH含量下降, SOD和T-AOC活力降低, CAT活力升高; 然而胁迫结束时其GSH含量、CAT、SOD和T-AOC活力均与对照组无显著差异($P>0.05$)。解除胁迫复氧72 h后, 2种规格刺参体腔液的4种抗氧化指标均恢复到对照组水平; 而呼吸树的这4种指标则未完全恢复。3 mg/L低氧胁迫期间, 2种规格刺参体腔液和呼吸树的GSH含量、CAT、SOD和T-AOC活力的变化趋势与1 mg/L组大体一致, 复氧72 h后体腔液的各项指标恢复到对照组水平; 除T-AOC, 呼吸树的其余3种指标亦完全恢复。低氧胁迫后小规格刺参的恢复能力高于大规格刺参。在DO为1 mg/L和3 mg/L条件下, 胁迫结束时2种规格刺参体腔液中的皮质醇含量显著高于对照组($P<0.05$), 且大规格刺参皮质醇含量高于小规格, 复氧后二者均恢复到对照水平。结果表明, 低氧胁迫持续时间不超过其半致死时间(本研究以24 h为例), 刺参可通过自身调节减轻机体的氧化损伤; 一旦超出半致死时间, 将产生不可逆损伤, 最终导致死亡。

关键词: 高温; 低氧; 刺参; 半致死时间; 代谢; 抗氧化能力; 皮质醇

中图分类号: S96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)01-0060-14

刺参又称仿刺参(*Apostichopus japonicus*), 主要分布于黄、渤海沿岸的辽宁、大连、山东及江苏北部浅海水域^[1], 其增养殖模式主要有底播增殖、池塘养殖、围堰养殖、深水井大棚和工厂化养殖等。刺参营养和保健价值极高, 因此其增养殖规模也逐年扩大。

近几年夏季, 山东半岛多地的近岸海域先后出现刺参大面积死亡现象, 其主要原因是海区出

现缺氧水层^[2]。溶解氧含量是水生动物的重要限制性环境因子, 也是衡量水体环境质量的重要指标之一。国内外关于溶解氧(DO)含量对水生动物影响的研究主要集中在其生长^[3-4]、发育^[5-7]、行为^[8-10]、代谢^[11-12]和抗氧化能力^[13-14]等方面, 其中鱼类相关的研究较多, 甲壳动物的研究主要集中在虾类, 软体动物多集中在贝类, 而溶解氧对刺参影响的相关报道较少。钱圆^[15]和郑慧等^[16]分别

收稿日期: 2017-02-20; 修订日期: 2017-04-24.

基金项目: 国家海洋公益性行业科研专项(201405010); 青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划项目(2015ASKJ02).

作者简介: 周晓梦(1992-), 女, 硕士研究生, 专业方向为渔业资源. E-mail: 447189590@qq.com

通信作者: 张秀梅. E-mail: xiumei1227@163.com

研究了不同溶氧条件下刺参的生理生态学响应机制和非特异性免疫酶活性;李根瑞等^[17]研究了低氧胁迫对刺参氧化应激指标的影响,但目前尚未见有关低氧胁迫对不同规格刺参的半致死时间及应激能力影响的研究。

本研究以夏季山东半岛人工鱼礁区增殖刺参大面积死亡为背景,研究了高温低溶解氧浓度下 2 种规格刺参的半致死时间、昼夜代谢、抗氧化及应激系统的变化,探究高温低氧对刺参相关生理生化指标的影响,为刺参浅海底播增殖和池塘养殖提供预警预报参数。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用刺参于 2016 年 9 月分两批购自胶南琅琊青岛英豪集团,半致死和代谢实验所用大规格刺参平均体重(31.68±3.29) g,小规格平均体重(11.12±1.82) g;酶活和激素分析用大规格刺参平均体重(33.83±4.22) g,小规格刺参平均体重(10.89±1.58) g。刺参运回后在中国海洋大学资源增殖生态学研究室循环水养殖系统中暂养 10 d。暂养期间水温保持在(25.0±0.5)℃,盐度 30 左右,光照周期 14L:10D。每天 17:00 过量投喂小规格刺参 1 次,大规格刺参此温度下进入夏眠不摄食。饲料由市售人工配合饲料与灭菌海泥按 1:5 的比例制成。每天清污换水 1 次,24 h 连续充气。

1.2 方法

1.2.1 高温和低氧胁迫对刺参半致死时间的急性实验 本实验只设 1 个溶氧浓度即(1.0±0.1) mg/L。实验在 25 L 白色方形塑料桶中进行。大规格组设置 3 个平行组,每桶放置 10 头刺参,共 30 头;小规格组设 2 个平行组,每桶放置 20 头刺参,共 40 头。先调整实验水体溶氧到预设浓度,再放入刺参开始实验。自缺氧胁迫开始,每 1 h 观察 1 次,从第 1 只刺参开始死亡后,每 0.5 h 观察 1 次,并记录刺参死亡数量和时间。

低氧海水的制备:在实验塑料桶中装满海水,充入高纯氮气,每 10 min 用美国 YSI 便携式溶氧仪测定水体中 DO 含量,当水体 DO 降低到 1 mg/L 以下时,停止充氮气,用保鲜膜密封桶口,氮气

充分混合后,YSI 测定此时的溶氧浓度并取水样用碘量法测定比对。

实验期间水体温度维持在(25.0±0.5)℃,不投喂、不充气。根据预实验结果,每 24 h 更换相应温度和溶氧的海水 1 次,以保证水体氨氮维持在正常水平。由于刺参呼吸耗氧和空气中氧气溶解到水体相抵消,实验过程中水体 DO 大致维持在 1 mg/L 左右。

1.2.2 高温和低氧胁迫下刺参昼夜代谢变化的实验 本实验设置 3 个溶氧梯度,分别为(1.0±0.1) mg/L、(3.0±0.1) mg/L 和正常氧含量(6.5 mg/L 左右)。实验采用改进的静水法,水浴控温(25.0±0.5)℃。于 2000 mL 锥形瓶中反应,并以保鲜膜封口。大规格每瓶 3 头,小规格每瓶 8 头,空白呼吸瓶不放刺参,每组设置 3 个平行。实验进行 4 h,昼代谢实验于 12:00 进行,夜代谢于 20:00 进行。水样中溶解氧含量采用改进的 Winkler 法^[18]测定,氨氮含量用次溴酸盐氧化法^[19]测定。

实验开始前刺参禁食 48 h,待排出肠道内粪便后用 DTC-1100 型电子天平称取刺参湿重。

1.2.3 高温和低氧胁迫对刺参抗氧化和应激系统影响的实验 实验开始前,刺参同样禁食 48 h。实验溶氧梯度和容器同 1.2.2。大规格实验组设置 9 个平行,每桶放置 10 头刺参,共 90 头;小规格实验组设 9 个平行,每桶放置 30 头刺参,共 270 头。低氧海水的制备同 1.2.1,实验期间温度保持在(25.0±0.5)℃。

实验持续 96 h,前 24 h 为缺氧和低氧胁迫实验,后 72 h 为解除胁迫后的恢复实验。测定酶活力的取样时间为胁迫开始后的 1 h、3 h、6 h、12 h、24 h 和复氧后的 1 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h,大规格组每个时间段取 5 头刺参,小规格组取 15 头;测定激素样品在胁迫开始后的 1 h、6 h、24 h 和复氧后的 1 h、6 h、24 h、48 h、72 h 取样,大规格组每个时间段取 8 头刺参,小规格组取 24 头。测定激素和酶活力取样重叠的时间依照 8 头或 24 头刺参的标准进行取样。胁迫解除后将刺参放入盛有 25 L 相应温度的常氧海水桶中进行恢复。恢复期间不投喂,正常充气,24 h 换水 1 次。每次从 9 个平行组中随机取样。

1.3 样品采集与分析

取样时, 刺参置于冰盘中, 从腹面剖开约 1 cm 小口, 用 1 mL 无菌注射器吸取体腔液, 大规格刺参每头吸取 2 mL 体腔液组成一个样本; 小规格刺参体腔液含量少, 为保证样本充足, 每头吸取 0.6 mL, 3 头刺参的体腔液共 1.8 mL 组成一个样本。沿腹面小口剖开刺参, 取出呼吸树, 大规格组每头刺参的呼吸树为一个样本, 小规格组 3 头刺参的呼吸树(每头刺参取样量大致相同)组成一个样本, 分别放入 2 mL 冻存管内, 于液氮中暂存。抽取的体腔液在 4℃、5000 r/min 下立即离心 15 min, 取上清液置于 2 mL 冻存管中, 连同呼吸树样本一起转入-80℃超低温冰箱保存待测。

测定的抗氧化指标有谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和总抗氧化能力(T-AOC), 测定的应激激素为皮质醇(cortisol)。上述指标严格按照南京建成生物工程研究所的试剂和说明书进行测定。

1.4 数据计算与分析

半致死时间(LT₅₀): 根据死亡率与概率单位转换关系表将死亡率换算成概率单位^[20], 与胁迫时间的对数值拟合, 得到反应时间同死亡率的线性表达式。根据该表达式反算出 1.0 mg/L 低氧胁迫下刺参的半致死时间。

$$y = algx + b$$

式中, y 为概率单位, x 为每头刺参死亡的时间(h), a 为回归方程直线的斜率, b 为回归方程直线的截距。

刺参单位体重耗氧率 OCR[oxygen consumption rate, $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$]的计算公式为:

$$\text{OCR}=(\text{DC}_0-\text{DC}_1)V/W/(T_1-T_0)$$

式中, DC_0 和 DC_1 分别为实验结束时空白呼吸瓶中和代谢瓶中溶氧的浓度($\mu\text{g}/\text{L}$), V 为呼吸瓶的体积(L), W 为实验刺参的湿重(g), T_0 和 T_1 分别为实验开始和结束时间(h)。

刺参排氨率 AER[ammonia-N excretion rate, $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$]的计算公式为:

$$\text{AER}=(N_1-N_0)V/(W\cdot t)$$

式中, AER 为排氨率[$\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$], N_0 、 N_1 分别为实验初始、结束时对照瓶中 $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量($\mu\text{g}/\text{L}$), V 为呼吸瓶体积, W 为实验刺参体重, t 为实验持续

时间。

利用分析软件 SPSS 19.0 对数据进行统计分析。数据以平均值 \pm 标准误($\bar{x}\pm\text{SE}$)表示, 数据结果采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P<0.05$ 表示有显著性差异。同时利用 Duncan 多重范围检验来比较数据之间的差异性。

2 结果与分析

2.1 高温和低氧胁迫下刺参的行为观察及其半致死时间

2.1.1 行为观察 缺氧胁迫初期, 刺参沿桶壁缓慢向上爬行, 紧贴桶口保鲜膜以使体表接触少量空气进行体表呼吸。随胁迫时间延长, 刺参逐渐失去附着能力, 掉落在桶中, 部分刺参泄殖腔一端膨大, 最后腐烂化皮死亡。

2.1.2 半致死时间 根据预实验结果, 本实验只测定了大、小 2 种规格的刺参在 25℃、1 mg/L DO 浓度下的半致死时间。大规格组取 30 头刺参进行致死实验, 损失刺参 4 头, 最终数量为 26 头, 计算得出 LT₅₀ 为 33.37 h。小规格组取 40 头刺参进行致死实验, 验证时损失刺参 6 头, 最终数量为 34 头, LT₅₀ 为 28.84 h。

基于时间-反应法^[21]评估的低氧胁迫下大、小 2 种规格刺参的半致死时间见表 1。

2.2 高温和低氧胁迫下刺参昼夜耗氧率和排氨率的变化

如图 1a 所示, 各 DO 浓度组中大规格刺参的昼间耗氧率差异显著($P<0.05$): 1 mg/L DO 浓度组中大规格刺参的夜间耗氧率为 1.32 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$, 显著低于 3 mg/L 组的 7.38 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 和常氧组的 6.97 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$ ($P<0.05$); 3 mg/L 组的耗氧率虽然略高于常氧组, 但二者之间差异不显著($P>0.05$)。如图 2a 所示, 常氧组大规格刺参的昼间排氨率为 0.42 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$, 显著高于 1 mg/L 的 0.29 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 和 3 mg/L 的 0.25 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$ ($P<0.05$)。除 3 mg/L 组的昼夜耗氧率差异显著($P<0.05$), 其余各组昼夜耗氧率和排氨率均无显著差异($P>0.05$)。总的来说, 1 mg/L DO 浓度下大规格刺参的代谢水平显著低于常氧对照组, 夜间代谢强度总体高于白天。

表 1 1 mg/L 低氧胁迫下 2 种规格刺参的半致死时间
 Tab. 1 Median lethal time of two sizes sea cucumber *Apostichopus japonicus* exposed to 1 mg/L dissolved oxygen

样本数/头 sample number		死亡时间/h time of death		死亡时间对数(x) logarithm of time of death		死亡率/% mortality		概率单位(y) probit		LT ₅₀ 值/h median lethal time	
L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S
1	1	29	25	1.4624	1.3979	4	3	3.2493	3.1192	33.37	28.84
2	2	30	25	1.4771	1.3979	8	6	3.5949	3.4452		
3	3	31	26	1.4914	1.4150	12	9	3.8250	3.6592		
4	3	31	26	1.4914	1.4150	15	12	3.9636	3.8250		
5	5	31	26	1.4914	1.4150	19	15	4.1221	3.9636		
6	6	32	26	1.5051	1.4150	23	18	4.2612	4.0846		
7	7	32	26	1.5051	1.4150	27	21	4.3872	4.1936		
8	8	32	27	1.5051	1.4314	31	24	4.5041	4.2937		
9	9	33	27	1.5185	1.4314	35	26	4.6147	4.3567		
10	10	33	27	1.5185	1.4314	38	29	4.6945	4.4466		
11	11	33	28	1.5185	1.4472	42	32	4.7981	4.5323		
12	12	33	28	1.5185	1.4472	46	35	4.8996	4.6147		
13	13	33	29	1.5185	1.4624	50	38	5.0000	4.6945		
14	14	34	29	1.5315	1.4624	54	41	5.1004	4.7725		
15	15	34	29	1.5315	1.4624	58	44	5.2019	4.8490		
16	16	34	29	1.5315	1.4624	62	47	5.3055	4.9247		
17	17	34	29	1.5315	1.4624	65	50	5.3853	5.0000		
18	18	35	29	1.5441	1.4624	69	53	5.4959	5.0753		
19	19	35	29	1.5441	1.4624	73	56	5.6128	5.1510		
20	20	35	29	1.5441	1.4624	77	59	5.7388	5.2275		
21	21	36	29	1.5563	1.4624	81	62	5.8779	5.3055		
22	22	36	29	1.5563	1.4624	85	65	6.0364	5.3853		
23	23	36	29	1.5563	1.4624	88	68	6.1750	5.4677		
24	24	37	29	1.5682	1.4624	92	71	6.4051	5.5534		
25	25	37	31	1.5682	1.4914	96	74	6.7507	5.6433		
26	26	38	31	1.5798	1.4914	100	76		5.7063		
	27		31		1.4914		79		5.8064		
	28		31		1.4914		82		5.9154		
	29		33		1.5185		85		6.0364		
	30		33		1.5185		88		6.1750		
	31		33		1.5185		91		6.3408		
	32		33		1.5185		94		6.5548		
	33		34		1.5315		97		6.8808		
	34		34		1.5315		100				

注: L 表示大规格刺参; S 表示小规格刺参。

Note: L denotes large-size sea cucumber *Apostichopus japonicus*; S denotes small-size sea cucumber *Apostichopus japonicus*.

如图 1b 和图 2b 所示, 各 DO 浓度组中小规格刺参的昼间和夜间耗氧率差异均极显著($P<0.01$); 1 mg/L 组昼间排氨率为 0.38 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$, 3 mg/L 组昼间排氨率为 0.41 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$, 分别与常氧组昼间排氨

率的 0.54 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$, 呈显著性差异($P<0.05$)。1 mg/L 组夜间排氨率为 0.36 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$, 分别与 3 mg/L 组的 0.58 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 和常氧组的 0.60 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 呈显著性差异($P<0.05$)。3 mg/L 组昼夜耗氧率和排氨率

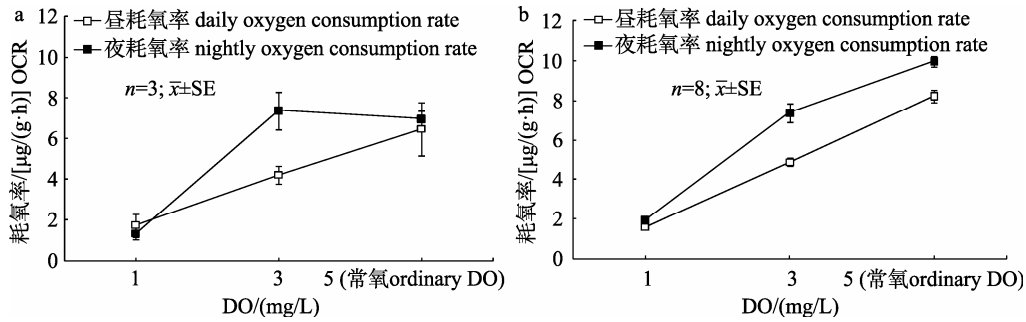


图 1 低氧胁迫对大规格(a)和小规格(b)刺参昼夜耗氧率的影响
大规格体重(31.68±3.29) g, 小规格体重(11.12±1.82) g.

Fig. 1 Effect of hypoxia on diurnal oxygen consumption rate of large-size (a) and small-size (b) sea cucumber *Apostichopus japonicus*

The mean weight of large-size is (31.68±3.29) g, the mean weight of small-size is (11.12±1.82) g.

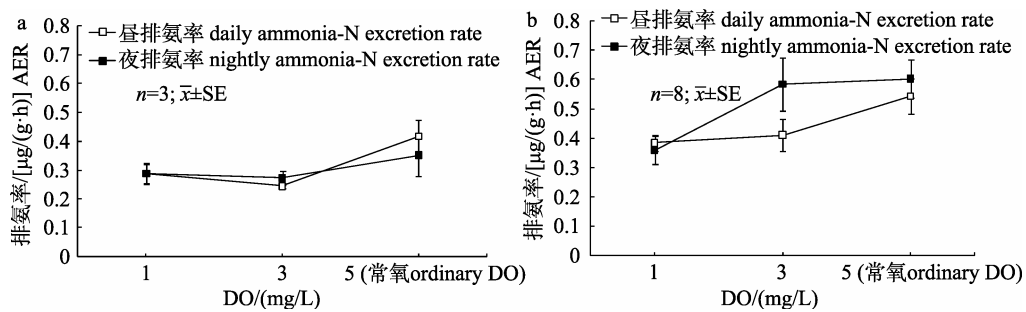


图 2 低氧胁迫对大规格(a)和小规格(b)刺参昼夜排氨率的影响
大规格体重(31.68±3.29) g, 小规格体重(11.12±1.82) g.

Fig. 2 Effect of hypoxia on diurnal ammonia-N excretion rate of large-size (a) and small-size (b) sea cucumber *Apostichopus japonicus*

The mean weight of large-size is (31.68±3.29) g, the mean weight of small-size is (11.12±1.82) g.

均呈显著差异($P < 0.05$)。同样, 1 mg/L DO 浓度下小规格刺参的代谢水平显著低于常氧对照组, 夜间代谢强度总体高于白天。

2.3 高温和低氧胁迫下刺参 4 种抗氧化指标的变化

图 3 表明, 在 1 mg/L DO 组中, 随胁迫时间延长至胁迫结束时, 大规格刺参体腔液的 GSH 含量显著低于对照水平($P < 0.05$), SOD 活力总体呈现下降趋势, CAT 活力呈先降低后升高的趋势, 但在胁迫 24 h 时与对照水平无显著差异($P > 0.05$); 胁迫 24 h 时 T-AOC 活力显著低于对照组($P < 0.05$); 胁迫 3 h 时小规格刺参体腔液 GSH 含量显著下降, 胁迫 24 h 时与对照组无显著性差异($P > 0.05$), SOD 活力呈现先升高后降低的趋势, CAT 活力呈先升高后降低的趋势, T-AOC 活力基本保持不变。胁迫 24 h 时 SOD、CAT 和 T-AOC 活力均与对照无显著差异($P > 0.05$)。复氧后第 72

小时, 大小规格刺参体腔液的 GSH 含量、SOD、CAT 和 T-AOC 活力均能恢复到与对照组无显著性差异($P > 0.05$)的水平。

图 4 表明, 在 3 mg/L DO 时, 胁迫期间 2 种规格刺参体腔液的 GSH 含量、CAT、SOD 和 T-AOC 活力的变化趋势与 1 mg/L 时大体一致。复氧后第 72 小时, 大小规格刺参体腔液的 GSH 含量、SOD、CAT 和 T-AOC 活力均能恢复到与对照组无显著性差异($P > 0.05$)的水平。

图 5 表明, 在 1 mg/L DO 组中, 随胁迫时间延长, 大规格刺参呼吸树的 GSH 含量先降低后升高, 在胁迫结束时与对照组无显著性差异($P > 0.05$), SOD 活力呈下降趋势, CAT 活力呈现升高趋势, 在胁迫 24 h 时显著高于对照水平($P < 0.05$); T-AOC 活力呈下降趋势, 胁迫结束时显著低于对照水平($P < 0.05$); 而小规格刺参呼吸树 GSH 含量呈下降趋势, 胁迫 24 h 显著低于对照水平($P < 0.05$); SOD

活力呈先升高后降低的趋势, 胁迫 24 h 显著低于对照水平($P<0.05$); CAT 活力呈现逐渐升高的趋势, 胁迫 24 h 显著高于对照水平($P<0.05$); T-AOC 活力变化比较平稳, 胁迫结束时与对照水平无显著性差异($P>0.05$)。复氧后第 72 h, 大规格刺参呼吸树的 GSH 含量显著低于对照水平($P<0.05$), SOD、CAT 活力显著高于对照水平($P<0.05$), T-AOC

活力显著低于对照水平($P<0.05$); 小规格刺参呼吸树 GSH 含量与对照水平无显著性差异($P>0.05$), SOD、CAT 和 T-AOC 活力均显著低于对照($P<0.05$)。

如图 6 所示, 在 3 mg/L DO 组中, 胁迫期间两种规格刺参呼吸树的 GSH 含量、CAT、SOD 和 T-AOC 活力的变化趋势与 1 mg/L 组大体一致。复氧第 72 小时, 两种规格刺参呼吸树的 T-AOC 活力均

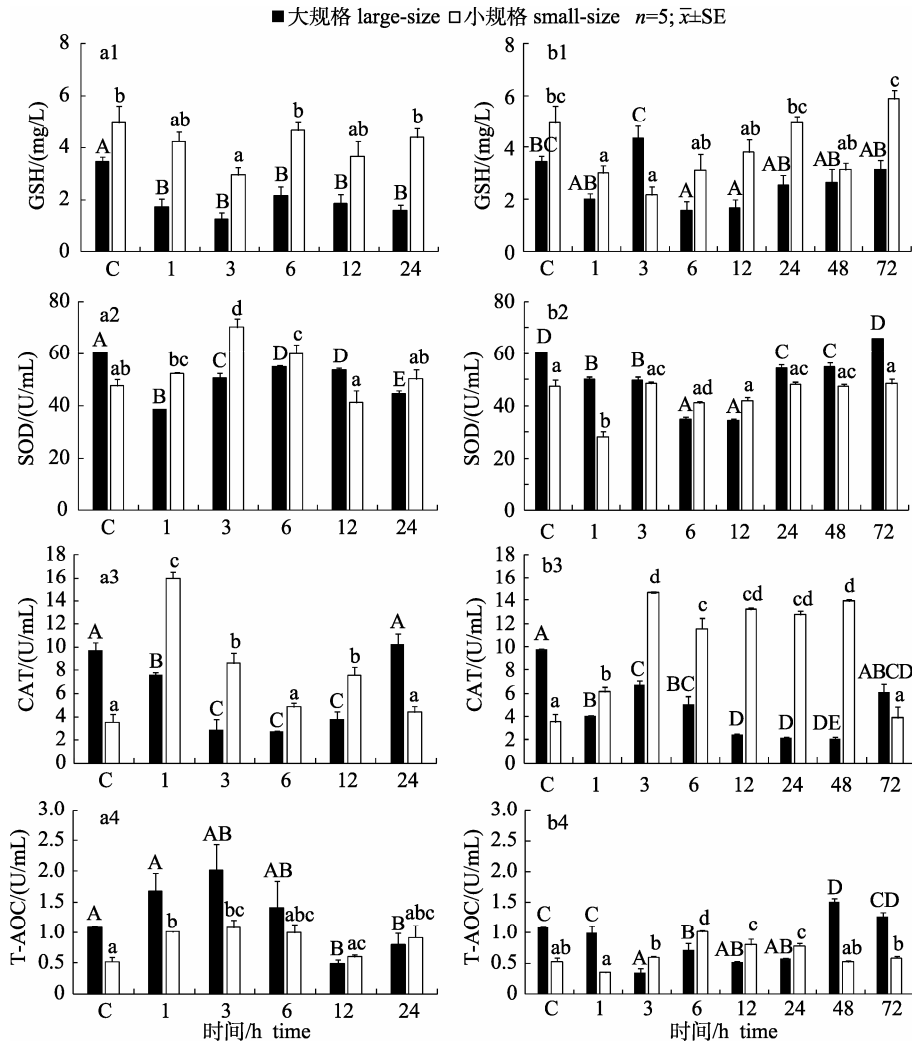


图 3 1 mg/L 低氧胁迫和复氧后 2 种规格刺参体腔液抗氧化指标的变化

a1、a2、a3、a4 分别代表胁迫阶段的 GSH 含量, SOD 活力, CAT 活力和 T-AOC 活力; b1、b2、b3、b4 分别代表复氧阶段的 GSH 含量, SOD 活力, CAT 活力和 T-AOC 活力。C: 对照; 上标大写字母不同表示大规格刺参不同处理时间之间差异显著($P<0.05$); 上标小写字母不同表示小规格刺参不同处理时间组间差异显著($P<0.05$)。

大规格体重(33.83±4.22) g, 小规格体重(10.89±1.58) g。

Fig. 3 Changes in the antioxidant indices in the coelomic fluid of two sizes of *Apostichopus japonicus* exposed to 1 mg/L hypoxia and reoxygenation

a1, a2, a3, and a4 denote the content of GSH, and the activities of SOD, CAT and T-AOC on the stage of stress, respectively. b1, b2, b3, and b4 represent the content of GSH, and the activities of SOD, CAT and T-AOC on the stage of reoxygenation, respectively. C: control group. Means with different superscript capital letters are significant different in large-size sea cucumber among different groups at various time ($P<0.05$). Means with different superscript lowercase letters are significant different in small-size sea cucumber among different groups at various time ($P<0.05$). The body weight of large-size is (33.83±4.22) g; the body weight of small-size is (10.89±1.58) g.

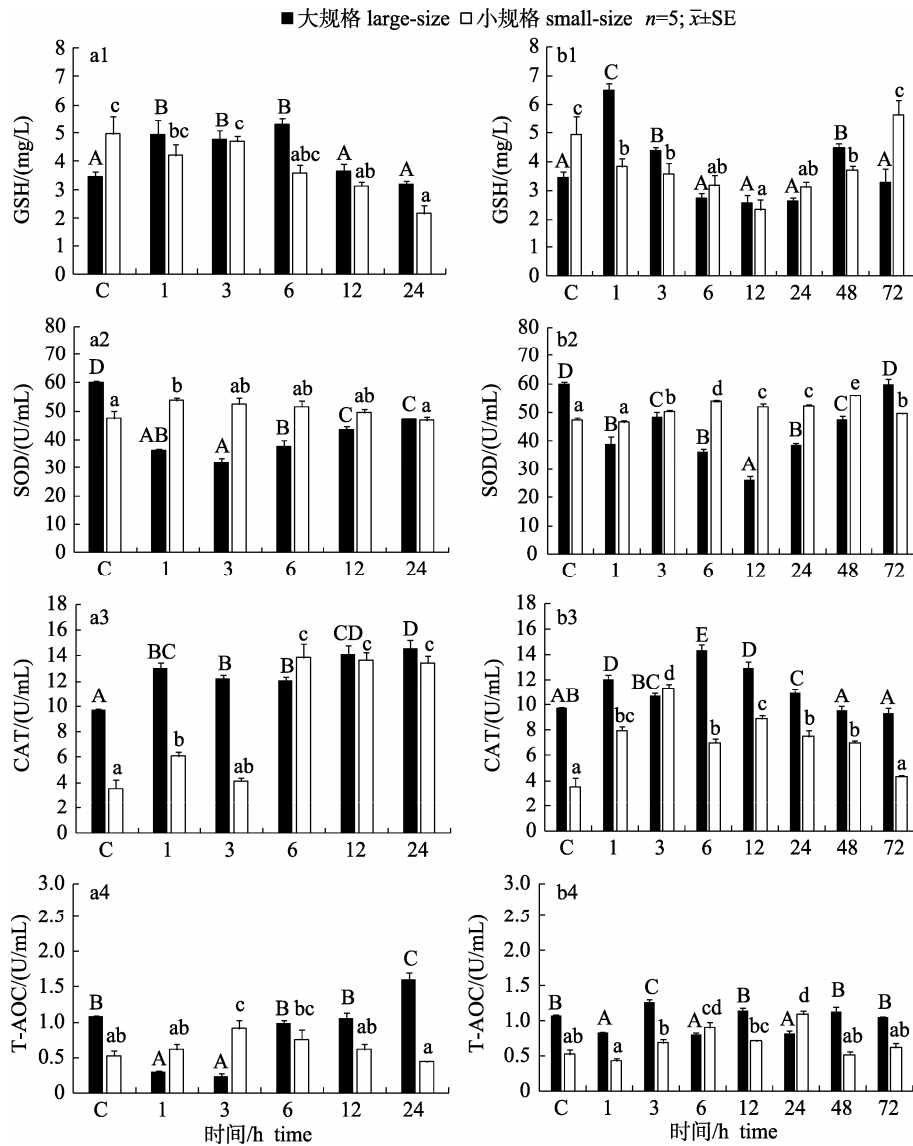


图 4 3 mg/L 低氧胁迫和复氧后 2 种规格刺参体腔液抗氧化指标的变化

a1、a2、a3、a4 分别代表胁迫阶段的 GSH 含量, SOD 活力, CAT 活力和 T-AOC 活力; b1、b2、b3、b4 分别代表复氧阶段的 GSH 含量, SOD 活力, CAT 活力和 T-AOC 活力。C: 对照; 上标大写字母不同表示大规格刺参不同处理时间之间显著 ($P < 0.05$); 上标小写字母不同表示小规格刺参不同处理时间组间差异显著 ($P < 0.05$)。

大规格体重(33.83 ± 4.22) g, 小规格体重(10.89 ± 1.58) g。

Fig. 4 Changes in the antioxidant indices in the coelomic fluid of two sizes of *Apostichopus japonicus* exposed to 3 mg/L hypoxia and reoxygenation

a1, a2, a3, and a4 denote the content of GSH, and the activities of SOD, CAT and T-AOC on the stage of stress, respectively. b1, b2, b3, and b4 represent the content of GSH, and the activities of SOD, CAT and T-AOC on the stage of reoxygenation, respectively. C: control group. Means with different superscript capital letters are significant different in large-size sea cucumber among different groups at various time ($P < 0.05$). Means with different superscript lowercase letters are significant different in small-size sea cucumber among different groups at various time ($P < 0.05$).

The body weight of large-size is (33.83 ± 4.22) g; the body weight of small-size is (10.89 ± 1.58) g.

显著低于对照水平 ($P < 0.05$); 其余 3 种指标均与对照水平无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.4 刺参体腔液皮质醇含量的变化

在 1 mg/L 低氧胁迫 1 h 后, 大规格刺参体腔液皮质醇含量为 33.83 ng/mL, 显著高于对照水平,

24 h 时为 34.93 ng/mL, 显著高于对照组的 29.95 ng/mL ($P < 0.05$); 在复氧阶段, 刺参体腔液皮质醇含量先升高后降低, 在复氧后第 72 小时恢复到与对照组无显著差异的 30.13 ng/mL ($P > 0.05$)。小规格刺参在 1 mg/L 低氧胁迫下 1 h 后, 体腔液

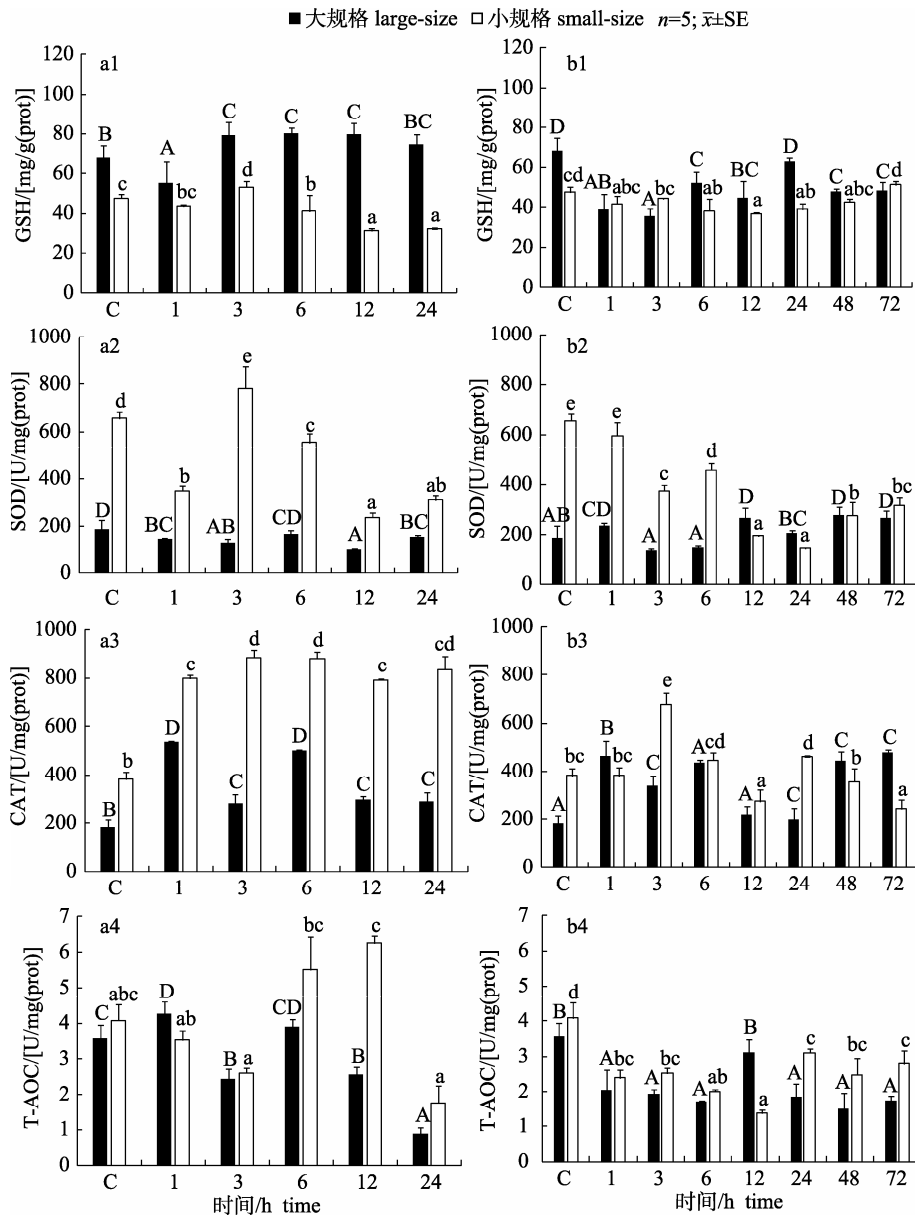


图 5 1 mg/L 低氧胁迫和复氧后 2 种规格刺参呼吸树抗氧化指标的变化

a1、a2、a3、a4 分别代表胁迫阶段的 GSH 含量, SOD 活力, CAT 活力和 T-AOC 活力; b1、b2、b3、b4 分别代表复氧阶段的 GSH 含量, SOD 活力, CAT 活力和 T-AOC 活力。C: 对照; 上标大写字母不同表示大规格刺参不同处理时间之间显著 ($P<0.05$); 上标小写字母不同表示小规格刺参不同处理时间组间差异显著 ($P<0.05$)。

大规格体重(33.83±4.22) g, 小规格体重(10.89±1.58) g。

Fig. 5 Changes in the antioxidant indices in the respiratory tree of two sizes of *Apostichopus japonicus* exposed to 1 mg/L hypoxia and reoxygenation

a1, a2, a3, and a4 denote the content of GSH, and the activities of SOD, CAT and T-AOC on the stage of stress, respectively; b1, b2, b3, and b4 represent the content of GSH, and the activities of SOD, CAT and T-AOC on the stage of reoxygenation, respectively. C: control group. Means with different superscript capital letters are significant different in large-size sea cucumber *Apostichopus japonicus* among different groups at various time ($P<0.05$). Means with different superscript lowercase letters are significant different in small-size sea cucumber *Apostichopus japonicus* among different groups at various time ($P<0.05$).

The body weight of large-size is (33.83±4.22) g; the body weight of small-size is (10.89±1.58) g.

皮质醇含量为 29.16 ng/mL, 显著高于对照水平, 胁迫结束时为 34.93 ng/mL, 显著高于对照组的 27.96 ng/mL ($P<0.05$); 复氧后 1 h, 体腔液皮质醇

水平仍显著高于对照组 ($P<0.05$), 后逐渐降低, 复氧第 72 h 后恢复到与对照组无显著差异的 26.12 ng/mL ($P>0.05$)。

大规模刺参受到 3 mg/L 低氧胁迫 6 h 后, 体腔液皮质醇含量为 33.88 ng/mL, 显著高于对照水平, 胁迫 24 h 时为 34.32 ng/mL, 显著高于对照组的 29.95 ng/mL ($P < 0.05$); 在复氧阶段, 刺参体腔液

皮质醇含量呈先升高后降低趋势, 最终在复氧后第 72 h 恢复到与对照组无显著差异的 30.40 ng/mL ($P > 0.05$)。小规格刺参受到 3 mg/L 低氧胁迫 1 h 后, 体腔液皮质醇含量为 29.67 ng/mL, 显著高于

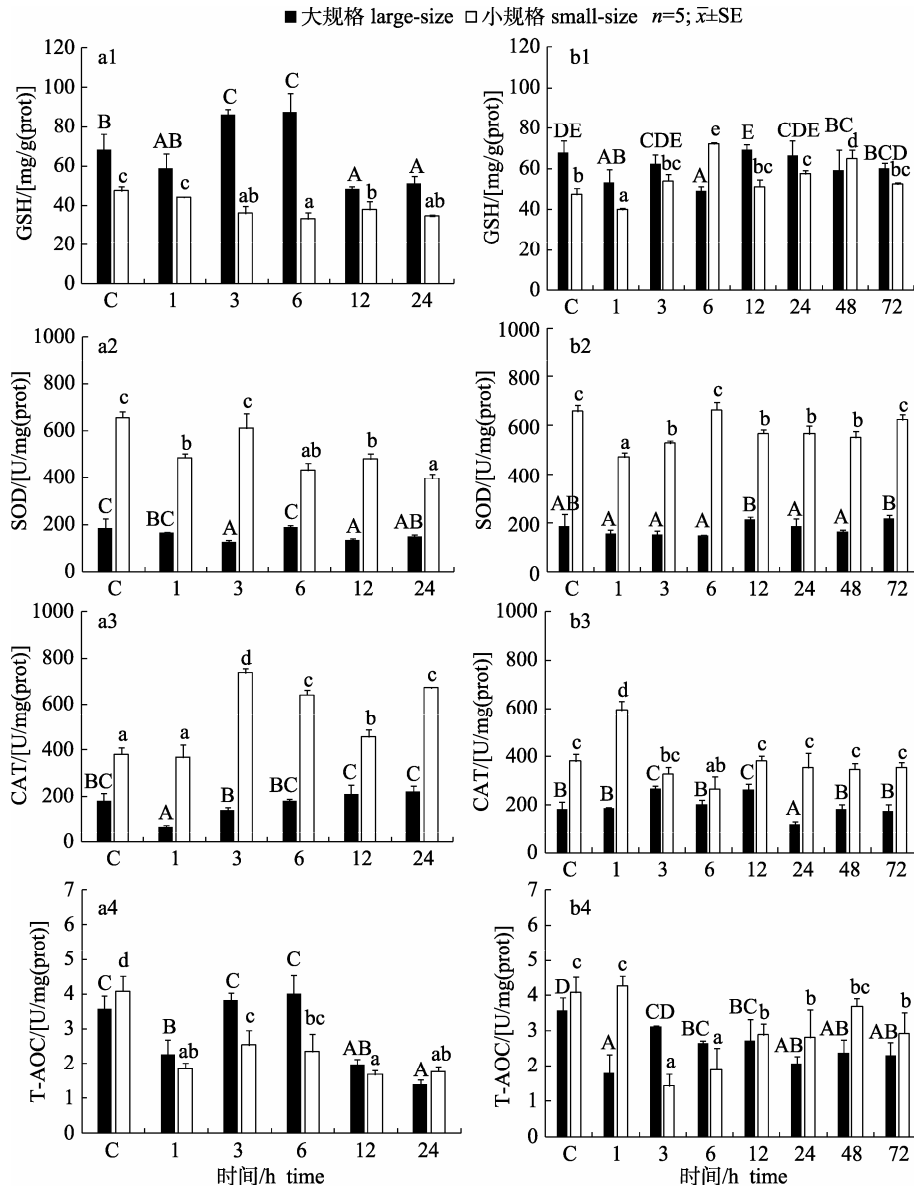


图 6 3 mg/L 低氧胁迫和复氧后 2 种规格刺参呼吸树抗氧化指标的变化

a1、a2、a3、a4 分别代表胁迫阶段的 GSH 含量, SOD 活力, CAT 活力和 T-AOC 活力; b1、b2、b3、b4 分别代表复氧阶段的 GSH 含量, SOD 活力, CAT 活力和 T-AOC 活力。C: 对照; 上标大写字母不同表示大规模刺参不同处理时间之间显著 ($P < 0.05$); 上标小写字母不同表示小规格刺参不同处理时间组间差异显著 ($P < 0.05$)。

大规模体重(33.83 ± 4.22) g, 小规格体重(10.89 ± 1.58) g。

Fig. 6 Changes in the antioxidant indices in the respiratory tree of two sizes of *Apostichopus japonicus* exposed to 3 mg/L hypoxia and reoxygenation

a1, a2, a3, and a4 denote the content of GSH, and the activities of SOD, CAT and T-AOC on the stage of stress, respectively; b1, b2, b3, and b4 represent the content of GSH, and the activities of SOD, CAT and T-AOC on the stage of reoxygenation, respectively. C: control group. Means with different superscript capital letters are significant different in large-size sea cucumber *Apostichopus japonicus* among different groups at various time ($P < 0.05$). Means with different superscript letters are significant different in small-size sea cucumber *Apostichopus japonicus* among different groups at various time ($P < 0.05$).

The body weight of large-size is (33.83 ± 4.22) g; the body weight of small-size is (10.89 ± 1.58) g.

对照水平, 胁迫结束时为 31.59 ng/mL, 显著高于对照组的 27.96 ng/mL ($P < 0.05$); 复氧后 1 h, 体腔液皮质醇水平仍显著高于对照组 ($P < 0.05$), 后逐渐降低, 72 h 后恢复到与对照组无显著差异的 26.13 ng/mL ($P > 0.05$)。

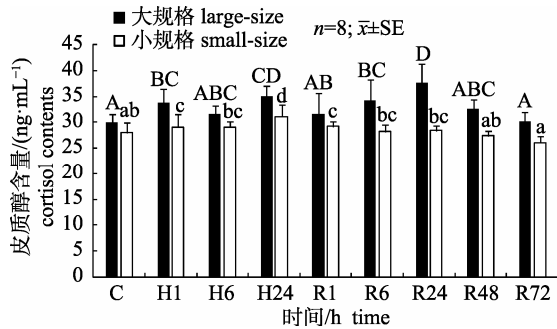


图 7 1 mg/L 低氧胁迫及复氧后 2 种规格刺参体腔液皮质醇含量的变化

C: 对照; H: 低氧胁迫; R: 复氧. 大规格体重(33.83±4.22) g, 小规格体重(10.89±1.58) g.

Fig. 7 Changes in contents of cortisol in the coelomic fluid of two sizes of *Apostichopus japonicus* exposed to 1 mg/L hypoxia

C: the control group; H: hypoxia stress group; R: reoxygenation group. The body weight of large-size is (33.83±4.22) g; the body weight of small-size is (10.89±1.58) g.

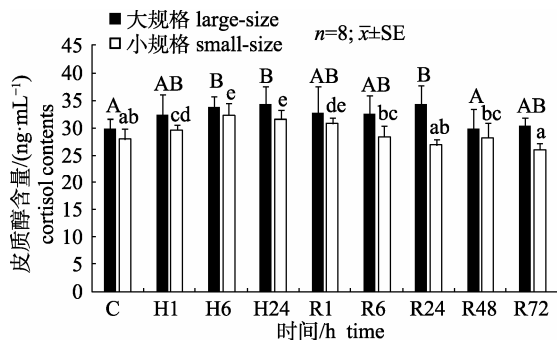


图 8 3 mg/L 低氧胁迫及复氧后两种规格刺参体腔液皮质醇含量的变化

C: 对照; H: 低氧胁迫; R: 复氧. 大规格体重(33.83±4.22) g, 小规格体重(10.89±1.58) g.

Fig. 8 Changes in contents of cortisol in the coelomic fluid of two sizes of *Apostichopus japonicus* exposed to 3 mg/L hypoxia

C: the control group; H: hypoxia stress group; R: reoxygenation group. The body weight of large-size is (33.83±4.22) g; the body weight of small-size is (10.89±1.58) g.

3 讨论

3.1 高温和低氧胁迫对刺参存活的影响

半致死率是研究动物对各种生态因子耐受极限的重要生理生态学指标^[22], 但有关低氧胁迫对

刺参半致死时间影响的研究甚少。

刺参耐低氧能力强, 在低氧条件下会出现窒息昏迷现象。王兴章等^[23]研究发现, 成参在水中溶氧量降至 1 mg/L、幼参在降至 3.3 mg/L 以下时会呈现缺氧反应: 丧失附着能力、躯体萎缩、腹面向上等, 并呈麻痹状态。有研究以幼参沉入杯底, 对轻微刺激无反应定为死亡^[24], 但本实验发现将这些“死亡”的刺参取出放入常氧海水中, 几小时后又可“复活”。为提高实验的可信度, 将胁迫后的刺参取出置于常氧条件下恢复 6 h 以判定其是否死亡。在 25℃、1 mg/L 条件下, 大规格刺参的 LT₅₀ 为 33.37 h, 小规格为 28.84 h, 表明大规格刺参耐低氧的能力高于小规格刺参。Eerkes-Medrano 等^[25]对 10 种岩礁潮间带无脊椎动物的实验发现, 早期幼体对缺氧的感知更敏感且缺氧耐受能力显著弱于成体。通常, 水生动物耐低氧能力从弱到强依次为: 鱼类、甲壳类、棘皮类、环节类、软体类^[26]。研究发现, 环节动物、棘皮动物和刺胞动物等海洋底栖动物低氧耐受力较强, 表现为较低的亚致死氧浓度和较长的半致死低氧耐受时间。其中, 水温为 5℃ 时暴露于缺氧环境 (PO₂ < 3 mm Hg) 的泥海星 (*Ctenodiscus crispatus*) 的存活时间高于文献中记录的其他任何棘皮动物, 半致死时间为 248 h^[27]; Vaquer-Sunyer 等^[28]研究表明, 当水温低于 20℃ 时刺胞动物的亚致死氧浓度低至 0.69 mg/L, 此 DO 浓度下其半致死时间长达 200 余 h。由此可见, 高温导致刺参半致死低氧耐受时间大幅度缩短。

3.2 高温和低氧胁迫对刺参代谢的影响

呼吸和排泄是生物能量学研究的重要内容。呼吸的强弱常用耗氧率 (OCR) 表示。刺参的排泄物包括氨、尿素和尿酸, 其中氨占总排泄量的 70%^[29]。

刺参属典型的昼伏夜出生物^[30-31]。本实验结果显示, 不同规格刺参的夜间代谢水平都高于白天, 在 3 mg/L DO 浓度下, 刺参夜间代谢水平显著高于白天 ($P < 0.05$), 且略高于常氧组 ($P > 0.05$)。Sturdivant 等^[32]研究发现, 缺氧期间双齿围沙蚕 (*Alitta succinea*) 幼体的耗氧率显著升高 ($P < 0.01$); 一些底层水生动物在严重缺氧时仍保持活跃, 暗

示一些物种不仅可以通过生理适应生存下来,还可以在贫氧条件下通过生物扰动作用维持底栖生态环境。刺参的体重与耗氧量间关系密切^[15, 33]。实验期间水温维持在 25℃左右,大规格刺参已进入夏眠状态,代谢减弱^[34-35],小规格刺参尚未夏眠,代谢强度总体大于大规格刺参。有研究称在夏眠过程中,刺参代谢率显著下降,耗氧率仅为活动时期的 20%~50%^[36];但本实验发现进入夏眠的大规格刺参并非处于不动状态,有的个体夜间仍能缓慢爬行,这与李馥馨等^[37]的研究结果一致。与常氧组相比,1 mg/L 组 2 种规格刺参的昼夜代谢水平都显著降低($P<0.05$)。由此可知,低氧导致刺参代谢减弱,这可能是其应对低氧胁迫的一种生存策略。

3.3 高温和低氧胁迫对刺参抗氧化系统的影响

本研究在 1 mg/L DO 条件下,胁迫结束时大规格刺参体腔液的 GSH 含量低于对照水平,说明 GSH 参与了对 ROS 的清除;CAT 活力随胁迫时间延长而增加,而 SOD 活力降低,其原因可能是 SOD 和 CAT 在功能上具有一定的互补性。这与管越强等^[38]的研究结果一致。T-AOC 活力随胁迫时间延长逐渐下降,说明机体抗氧化系统功能的降低。胁迫结束时大规格刺参呼吸树中的 GSH 含量呈先降低后升高的趋势,CAT、SOD 和 T-AOC 活力的变化趋势与体腔液类似;小规格刺参的呼吸树也表现出相似的变化趋势,但体腔液的 4 种抗氧化物质均与对照水平无显著差异。复氧后 72 h,2 种规格刺参体腔液的上述 4 种指标均能恢复到对照组水平;而呼吸树未能完全恢复,推测是由于体腔液内含有大量承担特异性免疫的体腔细胞,可在机体遭受氧化应激时及时做出反应,而呼吸树组织受到损伤往往需要更长时间的恢复。本研究表明,虽然小规格刺参的低氧耐受力弱于大规格个体,但其机体抗氧化能力较大规格刺参更强。

3 mg/L DO 条件下,2 种规格刺参体腔液和呼吸树的 GSH 含量、CAT、SOD 和 T-AOC 活力的变化趋势与 1 mg/L 组大体一致。复氧结束时,2 种规格刺参体腔液的上述 4 种指标均能恢复到对照组水平;除 T-AOC,呼吸树的其余 3 种指标亦

能恢复到对照组水平。

郑慧等^[16]研究发现,缺氧暴露时刺参的 SOD 活力降低,恢复正常溶氧后 SOD 活力恢复至正常水平。而本研究中低氧胁迫及复氧阶段 GSH 含量、CAT、SOD 和 T-AOC 活力的变化说明,溶解氧的剧烈波动显著影响刺参的抗氧化系统。Parrilla-Taylor 等^[39]和 de Oliveira 等^[40]的研究亦指出,这是生物体为适应低氧后又复氧而采取的一种抗氧化策略。

3.4 高温和低氧胁迫对刺参应激系统的影响

血液皮质醇激素因稳定性好、升高幅度及持续时间与应激源强度及作用时间呈正相关,被普遍视为灵敏的应激信号^[41-42]。目前,对皮质醇激素的研究多集中在鱼类等水生动物,而对刺参等低等水生动物研究尚少。王文博等^[43]研究发现鲫(*Carassius auratus*)受震荡后,血浆皮质醇浓度剧增($P<0.05$),但 72 h 可基本恢复正常。水体溶氧的急剧降低会引起斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)皮质醇水平的迅速升高^[44]。Pei 等^[45]研究了刺参体腔液的皮质醇,证实了刺参体腔液中皮质醇的存在。有学者认为,刺参体腔细胞相当于血细胞^[1],体腔液类似于血液^[46]。由于上述二者的功能相似,所以本实验以体腔液代替血液对刺参的皮质醇激素进行测定。结果发现,无论 1 mg/L 还是 3 mg/L DO 条件下,胁迫结束时 2 种规格刺参体腔液中的皮质醇含量均显著高于对照水平,复氧后 72 h 又均能恢复到对照水平。由此看出,短时间的低氧胁迫虽能引发刺参产生显著的应激反应,但较强的低氧耐受能力又使其在复氧后迅速恢复至正常状态。本研究结果可为夏季高温期刺参的浅海底播增殖和池塘养殖提供预警预报参数。

参考文献:

- [1] Liao Y L. Fauna Sinica, Echinoderm Animal, Holothuroidea [M]. Beijing: Science Press, 1997. [廖玉麟. 中国动物志, 棘皮动物门, 海参纲[M]. 北京: 科学出版社, 1997.]
- [2] Liu G S, Cai X Y, Tong F, et al. Investigation of massive death of sea cucumber in artificial reef zone of Shuangdao Bay, Weihai[J]. Fishery Information & Strategy, 2014, 29(2): 122-129. [刘国山, 蔡星媛, 佟飞, 等. 威海双岛湾人工鱼礁区刺参大面积死亡原因初探[J]. 渔业信息与战略, 2014, 29(2): 122-129.]

- [3] Pichavant K, Person-Le-Ruyet J, Bayon N L, et al. Comparative effects of long-term hypoxia on growth, feeding and oxygen consumption in juvenile turbot and European sea bass[J]. *Journal of Fish Biology*, 2001, 59(4): 875-883.
- [4] Wei L Z. Effects of low dissolved oxygen on the growth of Chinese shrimp, *Fennerpenaeus chinensis* and the mechanism[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010. [韦柳枝. 低溶解氧对中国明对虾生长的影响及其机制的实验研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.]
- [5] Wang H T, Zhang P J. Effects of environmental conditions on fertilized eggs and early larva of marine fishes[J]. *Marine Sciences*, 1998, 4(1): 50-52. [王宏田, 张培军. 环境因子对海产鱼类受精卵及早期仔鱼发育的影响[J]. *海洋科学*, 1998, 4(1): 50-52.]
- [6] Siikavuopio S I, Dale T, Mortensen A, et al. Effects of hypoxia on feed intake and gonad growth in the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*[J]. *Aquaculture*, 2007, 266(1): 112-116.
- [7] Shang E H, Yu R M, Wu R S. Hypoxia affects sex differentiation and development, leading to a male-dominated population in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(9): 3118-3122.
- [8] Zhao W W, Cao Z D, Fu S J. The effects of dissolved oxygen level on the swimming performances of juvenile *Parabramis pekinensis* and *Spinibarbus sinensis*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(2): 314-320. [赵文文, 曹振东, 付世建. 溶氧水平对鳊鱼、中华倒刺鲃幼鱼游泳能力的影响[J]. *水生生物学报*, 2013, 37(2): 314-320.]
- [9] Wu R S, Lam P K, Wan K L. Tolerance to, and avoidance of, hypoxia by the penaeid shrimp (*Metapenaeus ensis*)[J]. *Environ Pollut*, 2002, 118(3): 351-355.
- [10] Bell G, Eggleston D, Wolcott T. Behavioral responses of free-ranging blue crabs to episodic hypoxia. I. Movement[J]. *Marine Ecology - Progress Series*, 2003, 259: 215-225.
- [11] Zhang W B, LV Z B, Zhang Y, et al. Influence of hypoxia stress on physiological metabolism of *Ruditapes philippinarum*[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2014, 33(9): 2448-2453. [张文斌, 吕振波, 张莹, 等. 缺氧胁迫对菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*) 生理代谢的影响[J]. *生态学杂志*, 2014, 33 (9): 2448-2453.]
- [12] Xu H J, Ling Q F, Li Q, et al. Initial research of oxygen consumption rate of six freshwater shellfishes[J]. *Journal of Aquaculture*, 2010, 31(1): 1-4. [徐海军, 凌去非, 李倩, 等. 六种淡水贝类耗氧率的初步研究[J]. *水产养殖*, 2010, 31(1): 1-4.]
- [13] Wu Z H, You F, Wang Y F, et al. The effects of hypoxia and hyperoxia on nucleus anomaly, SOD, CAT activities and MDA content in juvenile turbot *Scophthalmus maximus*[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2011, 20(6): 808-813. [吴志昊, 尤锋, 王英芳, 等. 低氧和高氧对大菱鲆幼鱼红细胞核异常及氧化抗氧化平衡的影响[J]. *上海海洋大学学报*, 2011, 20(6): 808-813.]
- [14] Parrilla-Taylor D P, Zenteno-Savin T. Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation[J]. *Aquaculture*, 2011, 318(3): 379-383.
- [15] Qian Y. Experimental studies on different dissolved oxygen levels and exposure in air under different temperature in sea cucumber, *Apostichopus japonicus*[D]. Qingdao: Ocean University of China: 2011. [钱圆. 刺参对不同溶氧水平和干露的生理生态学响应及其机理研究[D]. 青岛: 中国海洋大学: 2011.]
- [16] Zheng H, Li B, Rong X J, et al. Effects of salinity and dissolved oxygen variation on the non-specific immune response of sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(1): 118-124. [郑慧, 李彬, 荣小军, 等. 盐度和溶解氧对刺参非特异性免疫酶活性的影响[J]. *渔业科学进展*, 2014, 35(1): 118-124.]
- [17] Li G R, Ren L H, Sun G H, et al. Effects of hypoxic stress on oxidative stress indices in sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 133-139. [李根瑞, 任利华, 孙国华, 等. 低溶氧胁迫对刺参 (*Apostichopus japonicus*) 氧化应激指标的影响[J]. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 133-139.]
- [18] Lei Y Z. Chemistry Experiments on Aquaculture Water Environment[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2006. [雷衍之. 养殖水环境化学实验[M]. 北京: 中国农业出版社, 2006.]
- [19] Bao J, Jiang H B, Dong S L, et al. Comparison of oxygen consumption rate and ammonia-N excretion rate between green type and red type sea cucumber *Apostichopus japonicus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37 (11): 1689-1696. [包杰, 姜宏波, 董双林, 等. 红刺参和青刺参耗氧率与排氨率的比较研究[J]. *水产学报*, 2013, 37(11): 1689-1696.]
- [20] Zhang Y R, Du Q C, Wang Y M, et al. Effects of TDG supersaturated water with sediment on juvenile *Schizothorax prenanti*[J]. *Journal of Hydraulic Engineering*, 2014, 45(9): 1029-1037. [张亦然, 杜秋成, 王远铭, 等. 总溶解气体过饱和含沙水体对齐口裂腹鱼影响的实验研究[J]. *水利学报*, 2014, 45(9): 1029-1037.]
- [21] Xu J B, Li Z H, Li S. Based on time-response approach to evaluate the median lethal time[J]. *Journal of Northeast Normal University (Natural Science Edition)*, 2014, 46(1): 135-138. [徐镜波, 李铸衡, 李爽. 基于时间-反应法评估半数死亡时间[J]. *东北师大学报: 自然科学版*, 2014, 46(1): 135-138.]
- [22] Cao Z D, Xie X J. Effects of temperature on the time of half-mortality, body weight and length in the southern catfish, *Silurus meridionalis*, at starvation[J]. *Journal of Southwest Normal University (Natural Science)*, 2002, 27(5): 746-750. [曹振东, 谢小军. 温度对南方鲇饥饿仔鱼的半致死时间及其体重和体长变化的影响[J]. *西南师范大学学报: 自然科学版*, 2002, 27(5): 746-750.]
- [23] Wang X Z, Xing X Z. A study on the status and technique of *Stichopus japonicus* Selenka in north of China[J]. *Modern Fisheries Information*, 2000, 15(8): 20-22. [王兴章, 邢信泽. 中国北方刺参 (*Stichopus japonicus* Selenka) 增养殖发展现状及技术探讨[J]. *现代渔业信息*, 2000, 15(8): 20-22.]

- [24] Li Q, Luo Y C, Li H, et al. Acute toxicity of common antibiotics and disinfectants to juvenile sea cucumber (*Apostichopus japonicus*)[J]. Journal of Dalian Fisheries College, 2005, 20(2): 105-110. [李强, 罗永成, 李华, 等. 常用抗菌药物和消毒剂对刺参幼体的急性毒性试验[J]. 大连水产学院学报, 2005, 20(2): 105-110.]
- [25] Eerkes-Medrano D, Menge B, Sislak C, et al. Contrasting effects of hypoxic conditions on survivorship of planktonic larvae of rocky intertidal invertebrates[J]. Marine Ecology - Progress Series, 2013, 478: 139-151.
- [26] Breitburg D L. Behavioral response of fish larvae to low dissolved oxygen concentrations in a stratified water column [J]. Marine Biology, 1994, 120(4): 615-625.
- [27] Shick J M. Physiological and behavioral responses to hypoxia and hydrogen sulfide in the infaunal asteroid *Ctenodiscus crispatus*[J]. Marine Biology, 1976, 37(3): 279-289.
- [28] Vaquer-Sunyer R, Duarte C M. Thresholds of hypoxia for marine biodiversity[J]. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 2008, 105(40): 15452-15457.
- [29] Yang H, Zhou Y, Zhang T, et al. Metabolic characteristics of sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) during aestivation[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2006, 330(2): 505-510.
- [30] Dong G C. Effects and mechanism of light and artificial shelter on behavior and growth of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2009. [董贯仓. 光照及投礁方式对刺参(*Apostichopus japonicus*)行为、生长的影响及其机制[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.]
- [31] Wang X G. The effects of environment factors on behavior and growth of sea cucumber *Apostichopus japonicus*[D]. Jinan: Shandong University: 2013. [王学广. 环境因子对刺参行为及生长影响的研究[D]. 济南: 山东大学: 2013.]
- [32] Sturdivant S K, Perchik M, Brill R W, et al. Metabolic responses of the Nereid polychaete, *Alitta succinea*, to hypoxia at two different temperatures[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 2015, 473: 161-168.
- [33] Bao J, Jiang H B, Tian X L, et al. Effects of temperature and salinity on oxygen consumption rate and ammonia-N excretion rate of red sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka)[J]. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(4): 116-121. [包杰, 姜宏波, 田相利, 等. 温度和盐度对红刺参(*Apostichopus japonicus*)耗氧率与排氨率的影响[J]. 渔业科学进展, 2015, 36(4): 116-121.]
- [34] Wang J Q, Tian X L. New Progress of Aquaculture Biology in Sea Cucumber *Apostichopus japonicus*[M]. Beijing: Ocean Press, 2012. [王吉桥, 田相利. 刺参养殖生物学新进展[M]. 北京: 海洋出版社, 2012.]
- [35] Chang Y Q, Ding J, Song J, et al. The Biology Research and Cultivation of Sea Cucumber and Sea Urchins[M]. Beijing: Ocean Press, 2004. [常亚青, 丁君, 宋坚, 等. 海参、海胆生物学研究与养殖[M]. 北京: 海洋出版社, 2004.]
- [36] Dong Y W, Dong S L. Advances of ecological physiology in sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka[J]. Periodical of Ocean University of China, 2009, 39(5): 908-912. [董云伟, 董双林. 刺参对温度适应的生理生态学研究进展[J]. 中国海洋大学学报, 2009, 39(5): 908-912.]
- [37] Li F X, Liu Y H, Song B X, et al. Study on aestivating habit of sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka) II. The factors relating to aestivation[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1996, 3(2): 49-57. [李馥馨, 刘永宏, 宋本祥, 等. 刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka) 夏眠习性研究 II—夏眠致因的探讨[J]. 中国水产科学, 1996, 3(2): 49-57.]
- [38] Guan Y Q, Li L, Wang H C, et al. Effects of hypoxia on respiratory metabolism and antioxidant capability of *Macrobrachium nipponense*[J]. Journal of Hebei University (Natural Science Edition), 2010, 30(3): 301-306. [管越强, 李利, 王慧春, 等. 低氧胁迫对日本沼虾呼吸代谢和抗氧化能力的影响[J]. 河北大学学报: 自然科学版, 2010, 30(3): 301-306.]
- [39] 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): 379-383.
- [40] de Oliveira U O, da Rosa Araújo A S, Belló-Klein A, et al. Effects of environmental anoxia and different periods of reoxygenation on oxidative balance in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology B, 2005, 140(1): 51-57.
- [41] Zhao J H, Yang D G, Chen J W, et al. Research and application on the biology of fish stress[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2011, 23(4): 394-401. [赵建华, 杨德国, 陈建武, 等. 鱼类应激生物学研究与应用[J]. 生命科学, 2011, 23(4): 394-401.]
- [42] Davis K B, Griffin B R, Gray W L. Effect of handling stress on susceptibility of channel catfish *Ictalurus punctatus* to *Ichthyophthirius multifiliis* and channel catfish virus infection[J]. Aquaculture, 2002, 214(1): 55-66.
- [43] Wang W B, Wang J G, Li A H, et al. Changes of cortisol and lysozyme levels in *Carassius auratus* blood after handling stress[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2004, 28(6): 682-684. [王文博, 汪建国, 李爱华, 等. 振荡胁迫后鲫血液皮质醇和溶菌酶水平的变化[J]. 水生生物学报, 2004, 28(6): 682-684.]
- [44] Tomasso J R, Davis K B, Parker N C. Plasma corticosteroid dynamics in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), during and after oxygen depletion[J]. Journal of Fish Biology, 1981, 18(5): 519-526.
- [45] Pei S, Dong S, Wang F, et al. Effects of density on variation in individual growth and differentiation in endocrine response of Japanese sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka)[J]. Aquaculture, 2012, 356: 398-403.
- [46] Ren S X. Invertebrate Zoology[M]. Beijing: Beijing University Press, 2007. [任淑贤. 无脊椎动物学[M]. 北京: 北京大学出版社, 2007.]

Effect of high temperature and hypoxia on median lethal time and physiological function in sea cucumber *Apostichopus japonicus* of two sizes

ZHOU Xiaomeng¹, ZHANG Xiumei^{1,2}, LI Wentao¹

1. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education; Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Functional Laboratory of Marine Fisheries Science and Food Production Process; Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China

Abstract: An experimental ecological method was used to determinate the effects of hypoxia on the median lethal time (LT₅₀) and physiological function of two sizes of sea cucumber *Apostichopus japonicus* (large-size: with a body weight ranging from 28.00 g to 36.00 g; small-size: with a body weight ranging from 9.00 g to 13.00 g) at high temperature (25°C). The LT₅₀ in the two sizes of sea cucumber at a dissolved oxygen (DO) concentration of 1 mg/L were investigated. The diurnal metabolism in the two sizes of sea cucumber at DO concentrations of 1, 3, and 6.5 mg/L (normoxia) were estimated. The glutathione (GSH) content and activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and total antioxidant capability (T-AOC) in the coelomic fluid and respiratory tree, as well as the cortisol level in the coelomic fluid at 24 h hypoxia stress (the DO concentrations of 1 mg/L and 3 mg/L) and 72 h reoxygenation of the two sizes of sea cucumber were also measured. The results showed that, at first, at the DO concentration of 1 mg/L, the LT₅₀ for the large and small-size sea cucumber was 33.37 h and 28.84 h, respectively. The metabolism in the two sizes of sea cucumber was significantly lower than that in the normoxia condition (hereafter control), the overnight metabolic intensity was higher than during the daytime, and metabolic intensity in the small-size sea cucumber was higher than in the large-size one. Secondly, during the 1 mg/L hypoxia stress, the variations of the four antioxidant indices in the coelomic fluid in the large-size sea cucumber and those in the respiratory tree in both sizes of sea cucumber were similar: compared with the control group, the hypoxia exposure decreased the content of GSH and the activity of SOD and T-AOC, but increased the activity of CAT. However, at the end of the hypoxia stress, the content of GSH and the activity of SOD, CAT, and T-AOC showed no significant difference from the control group. After 72 h of reoxygenation, the above four antioxidant indexes of the coelomic fluid in the two size groups of sea cucumber recovered to the level of the control group but the four antioxidant indexes of the respiratory tree did not. During the 3 mg/L hypoxia, the variation trend of the four antioxidant indexes in the coelomic fluid and respiratory tree of sea cucumber was consistent with those in the 1 mg/L group. After 72 h of reoxygenation, the above four antioxidant indexes of the coelomic fluid in sea cucumber recovered to the level of the control group. Except for T-AOC, the other three indices of the respiratory tree also recovered. The recovery ability of the small-size sea cucumber was higher than that of the large one after hypoxia stress. Thirdly, at the DO concentrations of 1 mg/L and 3 mg/L, the content of cortisol in the coelomic fluid of both sizes of sea cucumber was significantly higher than the control group at the end of the stress ($P < 0.05$). The level of cortisol in the coelomic fluid of the large-size sea cucumber was higher than in the small one but both recovered to the control level after reoxygenation. The results showed that if the hypoxia duration is less than the LT₅₀ (24 h, for example, in this paper), sea cucumber can alleviate the oxidative damage. However, if the time under hypoxia exceeds the threshold value, sea cucumbers will suffer irreversible damage and die.

Key words: high temperature; hypoxia; *Apostichopus japonicus*; median lethal time; metabolism; antioxidant ability; cortisol

Corresponding author: ZHANG Xiumei. E-mail: xiumei1227@163.com