



低氧胁迫下虾夷扇贝的行为特征及生理生化响应

夏玉莹^{1,2}, 张继红², 刘毅²

1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

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

摘要: 为研究低氧胁迫对虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)行为、生理生化(免疫防疫功能及关键呼吸酶)的影响, 设置了 1 mg/L、2 mg/L、4 mg/L、7 mg/L (对照组) 4 个溶解氧梯度, 测定分析了虾夷扇贝行为特征(外壳的开闭程度大小)、耗氧率、排氨率、抗氧化酶[超氧化物歧化酶(SOD), 过氧化氢酶(CAT)]和呼吸相关酶[乳酸脱氢酶(LDH)和丙酮酸激酶(PK)]活性的响应情况。结果发现: (1) 虾夷扇贝的存活率随着 DO 浓度的降低而降低, DO=1 mg/L 时的存活率仅为 55%; 在 DO=1 mg/L、2 mg/L 和 4 mg/L 时, 虾夷扇贝的半致死时间分别为 95.97 h、147.37 h 和 209.58 h。(2) 将扇贝行为特征划分为 5 个等级, 按照 0~4 赋分, 评分越高, 代表扇贝状态越好。从扇贝行为特性的量化指标来看, DO 浓度越低, 评分分数越低, 虾夷扇贝状态越差。(3) 低氧胁迫对虾夷扇贝耗氧率、排氨率有显著影响($P<0.05$), 在 $DO\leq 2$ mg/L 下, 氧氮摩尔比 <7 , 虾夷扇贝主要由蛋白质供能; $DO\geq 4$ mg/L, 虾夷扇贝由蛋白质和脂肪氧化供能为主。(4) 低氧胁迫对虾夷扇贝 SOD、CAT 和呼吸酶有显著性影响($P<0.05$)。24 h 的低氧胁迫使得肝胰腺及闭壳肌的自由基 ROS 浓度升高; 48~96 h 的低氧胁迫下, SOD、CAT 酶活开始降低。不同的溶解氧浓度下代谢途径不同, DO=2 mg/L 时, 有氧呼吸代谢转变为葡萄糖-丙酮酸-乳酸的呼吸途径; DO=1 mg/L 时, 呼吸代谢途径可能优先选择葡萄糖-琥珀酸途径。从生理生化层次上来看, 免疫功能下降和呼吸代谢途径改变可能会引起虾夷扇贝行为特征改变。

关键词: 虾夷扇贝; 低氧; 生理; 抗氧化酶; 呼吸关键酶

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)10-1319-10

溶解氧(DO)是影响海洋动物生长、繁殖、生存等的重要因子。受人类活动和全球气候变暖、水体层化、水体富营养化等的影响, 海洋低氧现象形成, “低氧区”的面积日趋扩大, 严重威胁着海洋生态环境和海洋生物的生长和生存^[1]。通常把 DO 浓度 ≤ 2 mg/L 作为缺氧判断的阈值^[2]。研究发现水体缺氧将影响贝类的行为, 诸如低氧下波罗的海蛤(*Macoma balthica*)的埋栖深度变浅^[3], 缺氧会降低紫扇贝(*Argopecten purpuratus*)的运动能力和开闭壳次数以及规避捕食者的能力^[4]。水体缺氧还会损害贝类的呼吸代谢、存活、生长以及贝类的酶活和免疫能力^[5-6], 甚至导致死亡^[7]。

虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)个体大, 味道鲜美, 营养价值高, 且生长快, 具有非常高的经济价值。但是, 养殖过程中的大规模死亡现象时有发生^[8], 高密度养殖和局部区域低氧可能是造成虾夷扇贝死亡的重要原因之一^[9]。据报道, 虾夷扇贝可通过改变行为特征和生理响应策略来应对低氧胁迫, 如壳的开闭频次、程度、新陈代谢的速率等^[10-11]。Seto 等^[12]通过生物学模型分析了虾夷扇贝对低氧的耐受性, 得出了夏季北海道 Notoro 湖底缺氧区(DO < 2 mg/L)扇贝半致死时间。而关于虾夷扇贝对低氧胁迫的行为响应(开闭壳)及生理、生化应激响应未见报道。

收稿日期: 2021-05-03; **修订日期:** 2021-06-17.

基金项目: 国家自然科学基金项目(41776155, U1906216); 农业农村部农业科研杰出人才及其创新团队培养项目(125A0301); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(20603022015017-2).

作者简介: 夏玉莹(1995-), 硕士研究生, 研究方向为虾夷扇贝行为生态学. E-mail: 952978423@qq.com

通信作者: 张继红, 博士, 研究员, 研究方向为养殖生态学与容量评估. E-mail: zhangjh@ysfri.ac.cn

本研究以虾夷扇贝为研究对象,测定了不同溶解氧浓度对其开闭壳特征和生理指标(呼吸耗氧、氨氮代谢)、生化指标(抗氧化酶 SOD 和 CAT,呼吸相关酶 LDH 和 PK)的影响,分析扇贝应对低氧胁迫的开闭壳表观行为,从生理、生化层次探讨虾夷扇贝应对低氧胁迫的行为响应机制,旨在为深入了解虾夷扇贝的行为学特性及低氧胁迫对虾夷扇贝的影响提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验装置

溶解氧和水温调控装置示意图见图 1。实验装置分为 5 个部分:实验水槽、供水槽、冷水器、气泵和继电器控制系统。维持水温、溶解氧控制及自动换水都是通过继电器控制相应电磁阀完成。溶解氧探头精度为 ± 0.1 mg/L,温度探头的精度为 ± 1 °C。实验水槽为透明亚克力材质,内径 44 cm,高度 57 cm。

1.2 实验设计

虾夷扇贝取自山东桑沟湾养殖海域。扇贝平均壳长(49.59 ± 4.74) mm。暂养期间定时投喂饵料金藻。根据水体中溶解氧低至 4 mg/L 将会对养殖生物带来不利影响^[13],低于 2.0 mg/L 通常作为水体低氧的判别阈值^[14],本实验设置 4 个浓度梯度,

分别为 1 mg/L、2 mg/L、4 mg/L 和 7 mg/L (对照组)。实验开始前,将扇贝至于 DO=7 mg/L 条件下,并进行 24 h 时的适应。通过充入氮气的方式降低水体中的溶解氧。以每 6 h 下降 25%的速度来下调溶解氧浓度,使其在 24 h 后达到目标值。之后开始正式实验。每个 DO 浓度梯度设置 3 个平行,每个平行 20 个扇贝。实验期间海水的温度为(15 ± 1) °C,盐度为 32.0 ± 0.5 。实验持续 96 h,每个处理组在目标值的正式实验中,均未对虾夷扇贝进行喂食。每天记录扇贝的存活情况,并将死亡的个体及时移除。

1.3 开闭壳行为学特性的观察及量化评价方法

双壳贝类的开闭壳行为及外套膜状态可以直观地反映贝类的生理状况,是一种反映贝类对环境变化响应的有效的行为指标。虾夷扇贝在正常生活状态时,两壳张开,外套膜外侧和内侧的触手向外伸展,并且可以看见外套眼和内脏团。当遇到环境胁迫时,通常先关闭双壳,随着胁迫持续,扇贝不得不开壳呼吸和摄食,当生理状态不良时,外套边缘退缩,甚至不能闭壳而死亡。实验分别在 24 h、48 h、96 h 观察 20 min,记录每个实验组 60 只扇贝的开闭壳行为状态和相应的数量。使用 El-Shenawy^[15]和 Anacleto 等^[16]的打分方法并做了一些修改(表 1),对扇贝开闭壳行为和生理

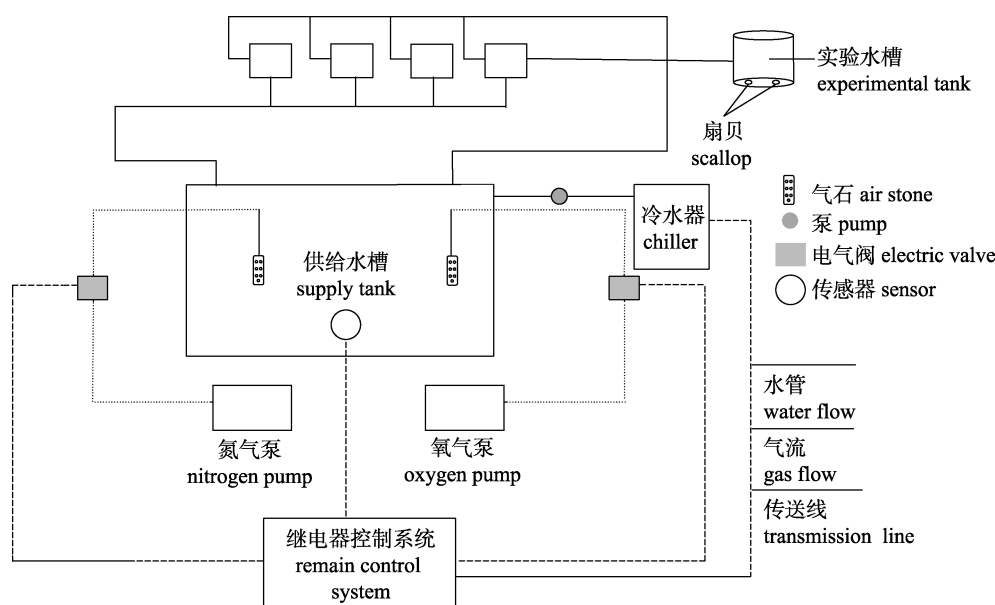


图 1 实验运行装置图

Fig. 1 Diagram of experimental operation device

表 1 扇贝活动打分标准
Tab. 1 Criteria used for scoring scallop activity

评价标准 criterion	得分 score
壳完全张开, 外套膜萎缩, 鳃丝粘连, 濒临死亡或死亡 Shell valve opening and mantle membrane edge shrinking, gill filaments being adhesive, dying or being dead	0
壳完全闭合 Shell valve completely closing	1
外套眼点清晰, 外套膜闭合, 外套膜缘良好 Mantle membrane closing, edge and eyes being clearly visible	2
外套眼点清晰, 上下两层外套膜之间有微小缝隙, 内脏不可见 Shell valve and mantle membrane opening a little and eyes being clearly visible but viscera being not clearly visible	3
外壳完全张开, 外套膜张开幅度大, 角度大可以看到鳃和健康的内脏 Shell valve and mantle membrane opening and both gill and viscera being visible	4

状态分了 5 个等级和赋分(0~4)。评分越高, 代表扇贝状态相对越好。各实验组的总得分为各实验组所有扇贝打分的总和。

1.4 耗氧率和排氨率的测定

分别在实验进行的 0 h、48 h、96 h 测定扇贝耗氧率和排氨率。所用容器为 1 L 烧杯, 每个烧杯放 1 个扇贝。实验设 3 个平行, 3 个空白对照。实验时间持续 2 h。装满水后用保鲜膜密封, 分别测定实验开始和结束时水体中的 DO 和氨氮浓度。根据 GB 17378. 4—2007《海洋监测规范》方法, 分别采用 Winkler 碘量法和次溴酸钠氧化法测定海水中的溶解氧(DO)和氨氮(NH₃-N)含量。虾夷扇贝的耗氧率[OCR, mg/(g·h)]、排氨率[NCR, mg/(g·h)]及氧氮比(O/N)计算公式如下:

$$\begin{aligned} \text{OCR} &= [(\text{DO}_0 - \text{DO}_T) \times V] / (w \times t) \\ \text{AER} &= [(N_T - N_0) \times V] / (w \times t) \\ \text{O/N} &= (\text{OCR}/16) / (\text{AER}/14) \end{aligned}$$

式中, DO₀ 和 DO_T 分别为测量开始时间和实验结束时水中溶解氧浓度(mg/L), N₀ 和 N_T 为测量开始时间和实验结束时水中氨氮浓度(mg/L), V 为试验瓶内水的体积(L), w 为虾夷扇贝软体部干重(g), t 表示实验持续的时间(h)。

1.5 抗氧化酶和呼吸酶的测定

每个实验组分别于实验的 0 h、12 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h 进行样品采集, 实验组在每个时间点随机采集 3 只实验扇贝, -80 ℃ 冰箱保存。

取 0.1 g 闭壳肌、外套膜、肝胰腺和鳃组织样品, 按照质量与体积比 1 : 9 加入预冷的 0.86% 生理盐水, 用组织研磨仪研磨成 10% 组织匀浆。将制备好的 10% 匀浆 4 ℃ 条件下 2500 r/min 离心

10 min, 取上清液, 其中, 闭壳肌和肝胰腺组织用于测定 SOD、CAT 等氧化应激指标, 闭壳肌和鳃用于测定 LDH、PK 等糖酵解酶活指标, 测试试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.6 数据分析

应用 SPSS 17.0 软件对低氧下虾夷扇贝的耗氧率、排氨率、抗氧化酶(SOD、CAT)和呼吸酶(LDH 和 PK 酶)数据进行单因素方差分析(one way ANOVA)。采用 Duncan 法进行组间多重比较; 不符合正态分布和方差齐性的采用 Kruskal-Wallis 检验进行均值比较。P<0.05 视为差异显著。

2 结果与分析

2.1 虾夷扇贝在不同溶解氧下的存活情况

虾夷扇贝的累计存活率随实验持续时间的变化情况见图 2。虾夷扇贝的存活率随着溶解氧浓度的降低而降低。从实验开始至 96 h 结束, 对照

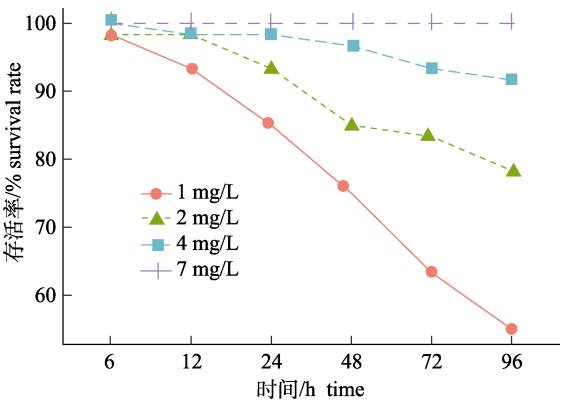


图 2 虾夷扇贝在不同溶解氧下的累计存活率
Fig. 2 Cumulative survival rate of *Patinopecten yessoensis* at different dissolved oxygen levels

组(DO=7 mg/L)的存活率一直保持在 100%; DO=4 mg/L 实验组的存活率达 92%; DO=2 mg/L 实验组, 在 24~48 h 之间, 存活率快速下降, 在实验结束时, 存活率为 78%; DO=1.0 mg/L 实验组的扇贝存活率最低, 约为初始的 55%。计算获得虾夷扇贝在 DO 浓度为 1 mg/L、2 mg/L 和 4 mg/L 时的半致死时间分别为 95.97 h、147.37 h 和 209.58 h。

2.2 虾夷扇贝的行为特征

不同溶解氧条件下虾夷扇贝活动总的得分情况见图 3。各实验组扇贝活动的累计总得分随着溶解氧浓度的降低而降低; DO=1 mg/L 条件下, 总得分随着实验时间的延长而降低, 96 h 的得分仅为初始值的 9%; DO=2 mg/L 条件下, 实验持续至 96 h 时, 总得分降低至初始值的 63%。

不同溶解氧条件下虾夷扇贝活动各个评分级别的占比情况见图 4。总体趋势为溶解氧越低, 状态越差的占比越大。状态极差和死亡(0 评分)

的百分比均随着时间的延长而增加, 紧闭外壳(1 评分)的数量随时间延长逐渐减少; 在 DO=1 mg/L 条件下, 得分 2 和 3 的百分比随时间延长而减少; 与其他 2 个实验组相比, 在 96 h 时, 得分为 0 的比例最高。DO=2 mg/L 和 DO=4 mg/L 条件下, 得分 3 和 4 的比例随时间的延长均增加。

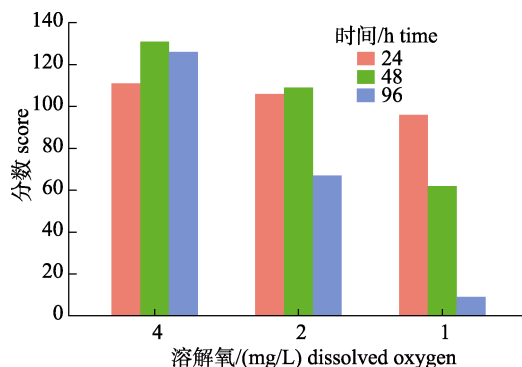


图 3 不同溶解氧条件下虾夷扇贝活动总的得分
Fig. 3 The total activity scores of *Patinopecten yessoensis* at different dissolved oxygen conditions

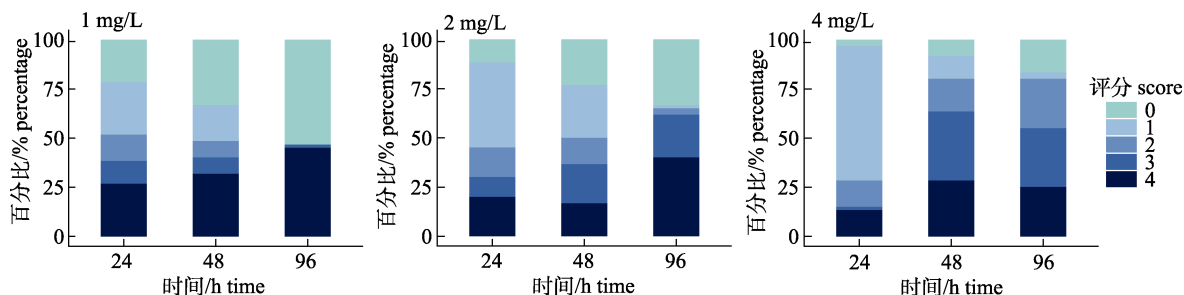


图 4 不同溶解氧条件下虾夷扇贝活动各个评分级别的百分比情况

Fig. 4 Percentage of each activity scoring level of *Patinopecten yessoensis* at different dissolved oxygen conditions

2.3 低氧胁迫对虾夷扇贝的耗氧率、排氨率及氧氮比的影响

虾夷扇贝的耗氧率、排氨率及氧氮比对低氧胁迫的响应情况如图 5 所示。方差分析结果显示, 溶解氧浓度和胁迫时间对耗氧率有显著影响 ($P<0.05$)。在 DO=1 mg/L、2 mg/L 和 4 mg/L 浓度下, 胁迫时间至 96 h 时, 耗氧率均显著降低 ($P<0.05$); 对于相同时间的不同 DO 组, DO=1 mg/L 和 2 mg/L 实验组的耗氧率显著低于 DO=4 mg/L 和 7 mg/L 实验组, 随着胁迫时间的延长, 在 96 h 时, 各实验组的耗氧率均存在显著差异 ($P<0.05$)。

方差分析结果显示, 溶解氧浓度和胁迫时间

对排氨率有显著影响 ($P<0.05$)。在 DO=2 mg/L 浓度下, 胁迫时间至 96 h 时, 排氨率显著降低 ($P<0.05$)。对于相同时间的不同 DO 组, 胁迫时间至 96 h 时, DO=1 mg/L 和 2 mg/L 实验组排氨率显著低于 DO=4 mg/L 和 7 mg/L 实验组 ($P<0.05$)。

方差分析结果显示, 溶解氧浓度和胁迫时间对氧氮比有显著影响 ($P<0.05$)。对于相同时间的不同 DO 组, 胁迫时间至 96 h 时, DO=1 mg/L 和 4 mg/L 实验组氧氮比显著低于 DO=2 mg/L 和 7 mg/L 实验组 ($P<0.05$), 在 DO=4 mg/L 和对照组 DO=7 mg/L, 虾夷扇贝氧氮比为 4.47 ± 0.31 和 8.7 ± 1.98 。在 DO=1 mg/L 和 2 mg/L 下, 虾夷扇贝氧氮比为 4.40 ± 0.53 和 7.28 ± 1.13 。

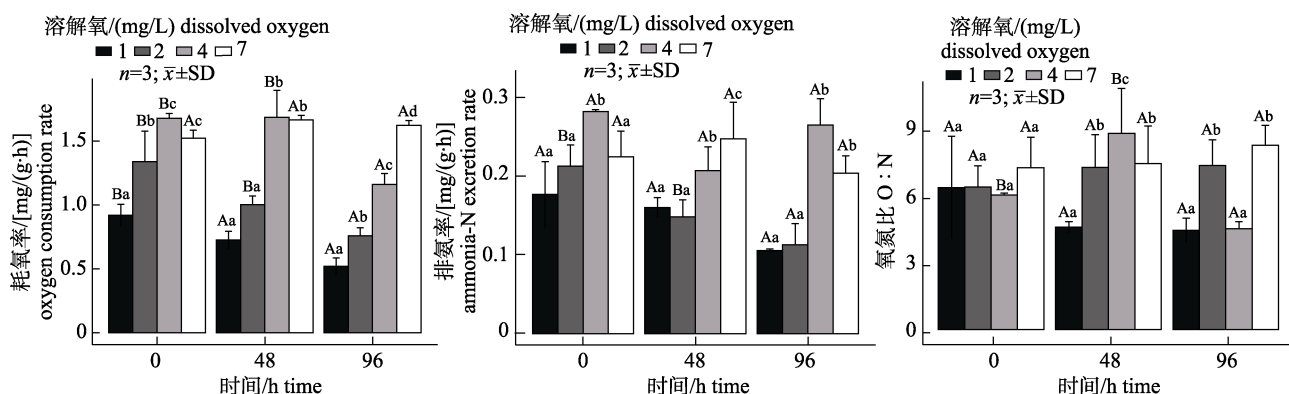


图 5 不同溶解氧浓度下虾夷扇贝的耗氧率、排氨率和氧氮比

大写字母代表同一溶解氧浓度不同时间之间的差异显著性; 小写字母代表相同时间不同溶解氧浓度之间的差异显著性. 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 5 Oxygen consumption rate, ammonia excretion rate and O/N ratio of *Patinopecten yessoensis* under different dissolved oxygen concentration

Values with different letters indicate significant difference ($P < 0.05$). Capital letters represent differences between times within the same dissolved oxygen concentration, and lowercase letters represent differences between different dissolved oxygen within the same time.

2.4 低氧胁迫对虾夷扇贝不同组织中抗氧化酶活性的影响

虾夷扇贝闭壳肌、肝胰腺中抗氧化酶(SOD)活性对低氧胁迫的响应见图 6。方差分析结果显示, 溶解氧浓度和胁迫时间对闭壳肌及肝胰腺组织中 SOD 酶活性均有显著影响($P < 0.05$)。对于同一 DO 实验组不同时间 DO=1 mg/L 实验组闭壳肌 SOD 活性波动较大, 表现出应激性升高然后下降, 再升高又下降的变化趋势; 其他 2 组闭壳肌 SOD

活性没有出现显著性的升高, 而是随胁迫时间的延长呈现先降低后升高的变化趋势。对于相同时间的不同 DO 实验组, 1 mg/L 组在实验开始(0 h) SOD 活性显著高于其他实验组($P < 0.05$), 而其他实验组间无显著性差异($P > 0.05$); 随着胁迫时间的延长, DO=2 mg/L 和 DO=4 mg/L 实验组的 SOD 活性显著低于对照组和 DO=1 mg/L 组, 而 DO=1 mg/L 实验组的 SOD 酶活性由初始的应激性升高开始下降; 在实验持续至 24 h 时, SOD 酶活性

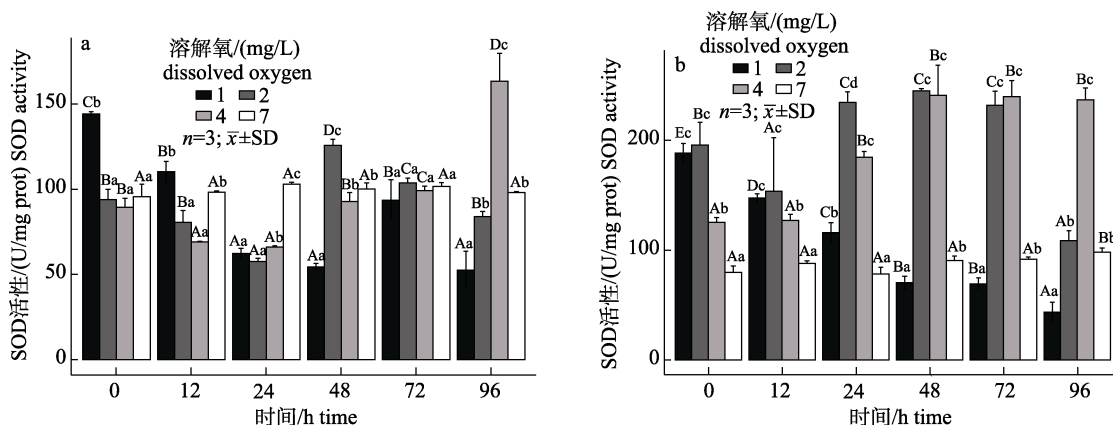


图 6 虾夷扇贝在不同溶解氧浓度下闭壳肌(a)和肝胰腺(b) SOD 酶活性

大写字母代表同一溶解氧浓度不同时间之间的差异显著性; 小写字母代表相同时间不同溶解氧浓度之间的差异显著性. 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$).

Fig.6 The activity of SOD enzyme in adductor muscle (a) and hepatopancreas (b) of *Patinopecten yessoensis* under different dissolved oxygen conditions

Values with different letters indicate significant difference ($P < 0.05$). Capital letters represent differences between times within the same dissolved oxygen concentration, and lowercase letters represent differences between different dissolved oxygen within the same time.

均显著低于对照组($P<0.05$)(图 6a)。

与闭壳肌相比,肝胰腺组织 SOD 酶活性对低氧胁迫的响应更为强烈(图 6b)。在 0 h 时,各实验组的 SOD 酶活性均出现显著的应激性升高($P<0.05$),之后,DO=1 mg/L 实验组的 SOD 活性随着时间的延长而降低,而其他 2 个实验组的 SOD 活性均呈现下降之后再显著升高的趋势($P<0.05$)。

虾夷扇贝闭壳肌、肝胰腺中抗氧化酶(CAT)活性对低氧胁迫的响应见图 7。方差分析结果显示,溶解氧浓度和胁迫时间对闭壳肌及肝胰腺 CAT 酶活性均有显著影响($P<0.05$)。因对照组中闭壳肌 CAT 酶波动比较大,在此只比较相同时间

不同实验组的差异。总体上,0 h 时,DO=1 mg/L 实验组的 CAT 酶活性受到抑制,DO=2 mg/L 和 DO=4 mg/L 实验组的 CAT 酶出现应激性升高(图 7a);在实验持续至 96 h 时,各胁迫组 CAT 酶活性与对照组相比显著降低($P<0.05$)。与闭壳肌相比,肝胰腺 CAT 酶活性对 DO 胁迫的响应比较弱。对于同一 DO 组的不同时间,各实验组肝胰腺 CAT 都随胁迫时间的延长呈现先升高再降低的变化趋势。在胁迫时间持续 24 h 时,2 mg/L 和 4 mg/L 实验组才出现应激,显著高于对照组;在 48 h 时,1 mg/L 和 2 mg/L 实验组显著高于对照组($P<0.05$);之后,各实验组间无显著性差异(图 7b)。

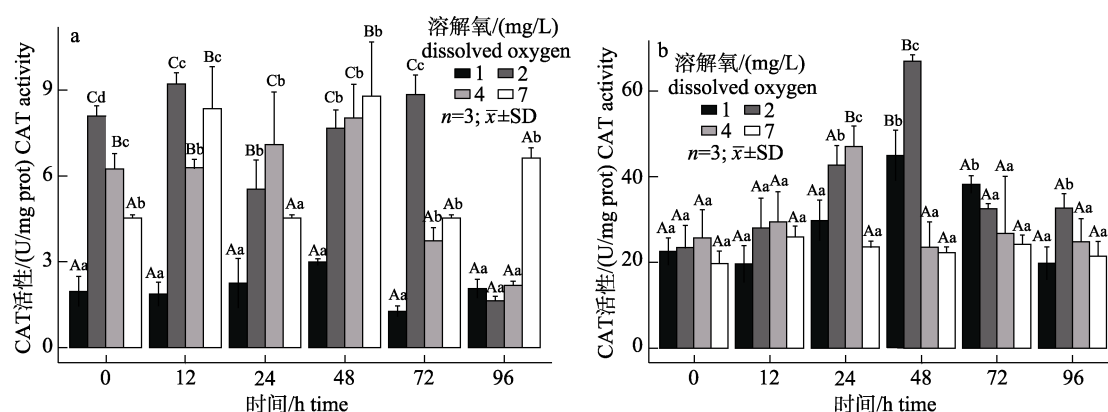


图 7 虾夷扇贝在不同溶解氧浓度下闭壳肌(a)和肝胰腺(b) CAT 酶活性
大写字母代表同一溶解氧浓度不同时间之间的差异显著性;小写字母代表相同时间
不同溶解氧浓度之间的差异显著性。不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

Fig. 7 CAT activity in adductor muscle (a) and hepatopancreas (b) of *Patinopecten yessoensis* under different dissolved oxygen conditions

Values with different letters indicate significant difference ($P<0.05$). Capital letters represent differences between times within the same dissolved oxygen concentration, and lowercase letters represent differences between different dissolved oxygen within the same time.

2.5 低氧胁迫对虾夷扇贝不同组织呼吸关键酶活性的影响

虾夷扇贝闭壳肌、外套膜中乳酸脱氢酶 LDH 的活性对低氧胁迫的响应见图 8。方差分析结果显示,溶解氧浓度和胁迫时间对闭壳肌 LDH 酶活性有显著影响($P<0.05$)。对于同一 DO 组的不同时间,除 4 mg/L 和 7 mg/L 实验组 LDH 酶活性比较稳定外,其他两组闭壳肌 LDH 酶活性都随胁迫时间的延长呈现先升高后降低的变化趋势;对于相同时间的不同 DO 组,与其他实验组相比在 2 mg/L 溶解氧胁迫下 LDH 酶活性显著升高($P<0.05$),

但在 1 mg/L (72~96 h), LDH 酶活性显著降低($P<0.05$)。

外套膜组织 LDH 酶活性对低氧胁迫的响应与闭壳肌类似,1 mg/L 和 DO=2 mg/L 组的外套膜 LDH 酶活性随胁迫时间的延长呈现先升高后降低的变化趋势,与其他实验组相比在 2 mg/L 溶解氧胁迫下得到明显的升高($P<0.05$),对于相同时间的不同 DO 组,1 mg/L, 96 h LDH 酶活性显著降低($P<0.05$)。

虾夷扇贝闭壳肌、鳃中丙酮酸激酶(PK)活性对低氧胁迫的响应见图 9。方差分析结果显示,溶

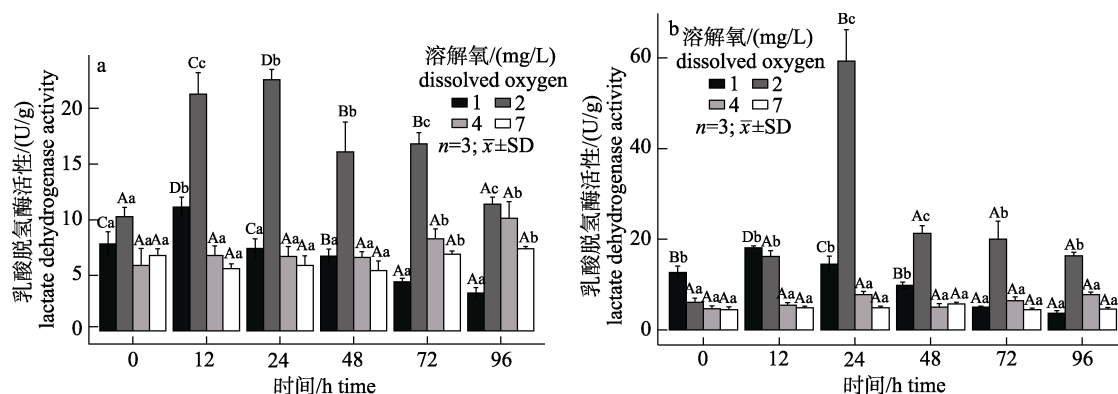


图 8 不同溶解氧浓度条件下虾夷扇贝闭壳肌(a)和外套膜(b) LDH 酶活性的变化

大写字母代表同一溶解氧浓度不同时间之间的差异显著性; 小写字母代表相同时间

不同溶解氧浓度之间的差异显著性。不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 8 LDH activity in adductor muscle (a) and mantle (b) of *Patinopecten yessoensis* under different dissolved oxygen conditions. Values with different letters indicate significant difference ($P < 0.05$). Capital letters represent differences between times within the same dissolved oxygen concentration, and lowercase letters represent differences between different dissolved oxygen within the same time.

解氧浓度和胁迫时间对闭壳肌 PK 酶活性有显著影响($P < 0.05$)。对于同一 DO 组的不同时间, 除 7 mg/L 实验组 PK 活性比较稳定外, 其他各组闭壳肌 PK 活性都随胁迫时间的延长呈现先升高后降低的变化趋势; 1 mg/L 组闭壳肌 PK 与其他组相

比显著降低($P < 0.05$)。

溶解氧浓度和胁迫时间对鳃 PK 酶活性也有显著影响($P < 0.05$)。对于相同时间的不同 DO 组, 2 mg/L 和 4 mg/L 组与对照组和 1 mg/L 组相比显著升高($P < 0.05$)。

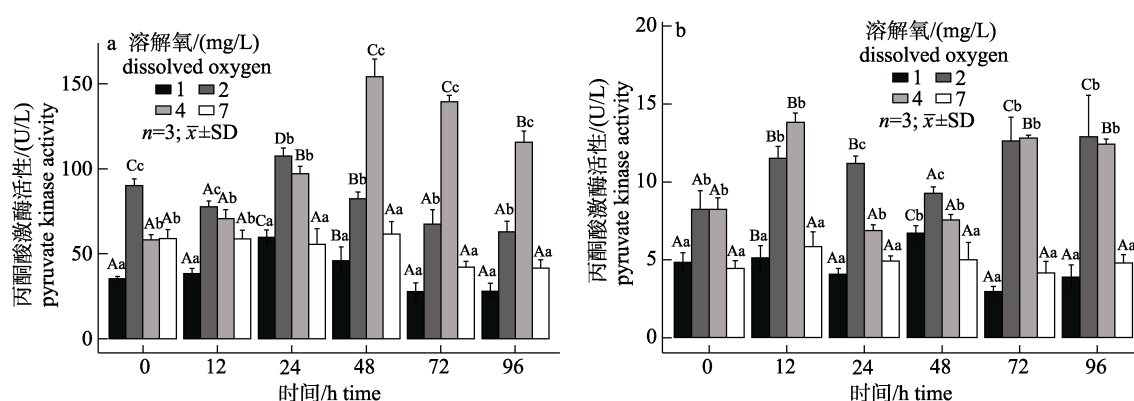


图 9 不同溶解氧浓度条件下虾夷扇贝闭壳肌(a)和鳃(b)丙酮酸激酶活性的变化

大写字母代表同一溶解氧浓度不同时间之间的差异显著性; 小写字母代表相同时间

不同溶解氧浓度之间的差异显著性。不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 9 PK enzyme activity in adductor muscle (a) and gill (b) of *Patinopecten yessoensis* under different dissolved oxygen conditions.

Values with different letters indicate significant difference ($P < 0.05$). Capital letters represent differences between times within the same dissolved oxygen concentration, and lowercase letters represent differences between different dissolved oxygen within the same time.

3 讨论

3.1 虾夷扇贝在低氧胁迫下的耐受性

半致死时间 LT_{50} 可以反映出生物对胁迫因子

的耐受能力。本研究中 DO=1 mg/L 条件时, LT_{50} =95.97 h; 2 mg/L 时, LT_{50} =147.37 h, 与 Seto 等^[12]的研究结果(DO=1 mg/L 时, LT_{50} 为 63~96 h)略有差异, 可能是因为扇贝的规格和实验条件所

导致的, 本实验选用的是 1~2 龄虾夷扇贝, 实验是在室内静水进行的, 而在自然海区扇贝可能面临着更多的生存挑战, 生存率更低。已有的研究结果显示, DO=1.5 mg/L 条件下, 栉孔扇贝的半致死时间为 432 h, 在 DO=0.5 mg/L 的低氧环境下, 菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)的半致死时间约为 422 h^[17]。可见, 与栉孔扇贝、菲律宾蛤仔相比, 虾夷扇贝对低氧胁迫的耐受性更差, 低氧胁迫对虾夷扇贝的存活有显著的影响。

3.2 虾夷扇贝对低氧胁迫的行为响应特征

行为学可直观地反映出生物对低氧胁迫的响应情况。从贝类行为特征随时间的变化趋势来看, DO=2 mg/L 和 DO=4 mg/L 实验组的变化趋势都是随时间的延长总分数先升高再降低。这与 Hao 等^[14]研究的高温胁迫下虾夷扇贝的行为及 Hégaret 等^[18]研究的毒素胁迫下扇贝(*Argopecten purpuratus*)的反应相一致。说明当虾夷扇贝受到环境变化的刺激时, 会先紧闭双壳, 适应该环境一段时间之后, 再慢慢张开双壳。但是当 DO=1 mg/L 时, 虾夷扇贝总分数随时间的延长一直呈现降低的趋势, 在 DO≤2 mg/L 时, 随着时间增加, 虾夷扇贝行为评分为 0 的比例明显增加, 出现了外套膜萎缩、鳃丝粘连等现象。可见, 严重的低氧胁迫会影响虾夷扇贝的行为特征, 并导致死亡率显著升高。

3.3 行为响应的生理生化机制探讨

生物的耗氧率和排氨率的大小可以反映生物代谢活动的强弱。本实验耗氧率随着水体中溶氧浓度的下降而呈现下降趋势, 与 Artigaud 等^[19]研究的欧洲扇贝(*Pecten maximus*)通过降低呼吸来维持和储存能量的结论一致。尤其是在 DO=1 mg/L 时, 虾夷扇贝的呼吸显著受到了抑制。氧氮比(O:N)反映生物体代谢中所动用的能源物质的组成结构。当氧氮比≤7 时, 生物体的全部能量由蛋白质分解来提供^[20], 在本研究中, 当 DO<4 mg/L, 以蛋白质供能为主, 说明了虾夷扇贝蛋白质代谢受短期低氧胁迫的影响相对较大。

为了使自身的新陈代谢能与低氧环境相适应, 海洋生物通常会在生化层面上进行必要的调节^[21], CAT 和 SOD 是生物体内抗氧化反应机制的重要

成员, 具有清除和平衡细胞内活性氧自由基(ROS)的作用, 是检测贝类免疫防御能力的重要指标。在常氧状态下, ROS 的产生和消除处于一种动态平衡, 低氧带来的氧化胁迫会导致底栖生物氧化应激, 过量的 ROS 会造成生物体内氧化应激和抗氧化体系的紊乱^[22-23], 并致使免疫能力降低^[24]。在本实验中, 溶解氧胁迫初期 24 h, 各实验组虾夷扇贝体内的 CAT、SOD 活性均发生积极的响应, 随时间的延长, 酶活随外界环境变化发生相应的改变, 使机体在胁迫中能保持平衡状态; 在 DO=2 mg/L 24 h 之后, 其闭壳肌和肝胰腺组织的 CAT、SOD 活性显著增强, 机体处于氧化应激状态, 启动抗氧化防御体系来清除过量产生的 ROS; DO=1 mg/L, CAT、SOD 活性开始降低, 原因可能是虾夷扇贝自身调节压力过大, 体内生理状态出现紊乱。

葡萄糖作为能源物质在缺氧条件下拥有多条代谢通路。大多数海洋底栖生物会选择葡萄糖-琥珀酸途径, 糖酵解与部分三羧酸循环的逆反应进行耦合, 在无氧条件下生成 ATP。例如蛤仔及海湾扇贝在低氧环境下更加倾向于由磷酸烯醇式丙酮酸-琥珀酸代谢途径来提供能量^[25-26], 也有很多生物的乳酸脱氢酶(LDH)会还原丙酮酸倾向于生成乳酸, 选择葡萄糖-乳酸代谢途径, 这个途径会生成乳酸等酸性物质, 不利于细胞稳态的维持^[27]。丙酮酸激酶(PK)是糖酵解过程中重要的限速酶, 负责催化由磷酸烯醇式丙酮酸转化为丙酮酸的反应。在低氧压力下, 会抑制丙酮酸激酶的活性, 磷酸烯醇式丙酮酸可以通过转化为草酰乙酸并进行三羧酸循环的逆反应释放更多的 ATP^[28]。本研究发现, DO=2 mg/L, LDH 活性升高, 虾夷扇贝可能倾向于生成丙酮酸-乳酸的代谢通路, 导致虾夷扇贝乳酸积累过多, 细胞膜受损, 细胞稳态受到破坏。为保护细胞稳态, 在 DO=1 mg/L, LDH 和 PK 会降低甚至抑制, 虾夷扇贝可能选择了磷酸烯醇式丙酮酸-琥珀酸代谢途径, 也可能选择某些冠羧碱脱氢酶的催化下生成了亚氨基酸等其他代谢的途径。对于虾夷扇贝在低氧下具体的无氧代谢途径还需要进一步的探究。

综上所述, 当扇贝通过闭合等行为应对缺氧

时, 生理响应也随着发生改变, 包括降低有氧呼吸强度、改变呼吸代谢途径(呼吸方式转变为无氧呼吸方式, 呼吸途径为丙酮酸-乳酸的代谢途径); 同时, 为了提供扇贝生存所需能量, 供能方式以蛋白质代谢供能为主; 随着低氧持续时间的延长, 乳酸积累可能造成虾夷扇贝外套膜内缩、鳃丝粘连、免疫功能下降和呼吸代谢途径改变, 从而导致机体代谢紊乱, 细胞稳态失衡, 死亡率增加。

参考文献:

- [1] Díaz R J, Rosenberg R. Marine benthic hypoxia: A review of its ecological effects and the behavioral responses of benthic macrofauna[J]. *Oceanography and Marine Biology*, 1995, 33: 245-303.
- [2] Turner R E, Rabalais N N, Swenson E M, et al. Summer hypoxia in the northern Gulf of Mexico and its prediction from 1978 to 1995[J]. *Marine Environmental Research*, 2005, 59(1): 65-77.
- [3] Long W C, Brylawski B J, Seitz R D. Behavioral effects of low dissolved oxygen on the bivalve *Macoma balthica*[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 2008; 359(1): 34-9.
- [4] Brokordt K, Pérez H, Campos F. Environmental hypoxia reduces the escape response capacity of juvenile and adult scallops *Argopecten purpuratus*[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2013, 32(2): 369-376.
- [5] Aguirre-Velarde A, Jean F, Thouzeau G, et al. Effects of progressive hypoxia on oxygen uptake in juveniles of the Peruvian scallop, *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819)[J]. *Aquaculture*, 2016, 451: 385-389.
- [6] Aguirre-Velarde A, Pecquerie L, Jean F, et al. Predicting the energy budget of the scallop *Argopecten purpuratus* in an oxygen-limiting environment[J]. *Journal of Sea Research*, 2019, 143: 254-261.
- [7] Altieri A H, Witman J D. Local extinction of a foundation species in a hypoxic estuary: Integrating individuals to ecosystem[J]. *Ecology*, 2006, 87(3): 717-730.
- [8] Yu Z A, Li D C, Wang X Y, et al. Reasons of massive mortality of Japanese scallop (*Patinopecten yessoensis*) in raft cultivation in coastal Changhai, Liaoning Province[J]. *Fisheries Science*, 2018, 37(2): 174-180. [于佐安, 李大成, 王笑月, 等. 长海县筏养虾夷扇贝大规模死亡原因的初步研究[J]. *水产科学*, 2018, 37(2): 174-180.]
- [9] Ran X B, Zang J Y, Wei Q S, et al. Hypoxia and its cause of formation in the adjacent waters of Rushan Bay[J]. *Advances in Marine Science*, 2012, 30(3): 347-356. [冉祥滨, 臧家业, 韦钦胜, 等. 乳山湾邻近海域低氧现象及成因浅析[J]. *海洋科学进展*, 2012, 30(3): 347-356.]
- [10] Laing I, Spencer B E. Bivalve cultivation: criteria for selecting a site[R]. Cefas Science Series Technical Report, 2006, 136: 34.
- [11] Zhang Y, Wu H F, Wei L, et al. Effects of hypoxia in the gills of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* using NMR-based metabolomics[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2017, 114(1): 84-89.
- [12] Seto M, Hattori S, Nii H. Basic research on Japanese scallop's ability on purifying water by filtration[J]. *Proceedings of Civil Engineering in the Ocean*, 2005, 21: 247-252.
- [13] Suzuki K, Sawa Y, Kaneda Y, et al. Overexpressed heat shock protein 70 attenuates hypoxic injury in coronary endothelial cells[J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 1998, 30(6): 1129-1136.
- [14] Hao Z L, Tang X J, Ding J, et al. Effect of high temperature on survival, oxygen consumption, behavior, ammonia-N excretion, and related immune indicators of the Japanese scallop *Mizuhopecten yessoensis*[J]. *Aquaculture International*, 2014, 22(6): 1863-1876.
- [15] El-Shenawy N S. Heavy-metal and microbial depuration of the clam *Ruditapes decussatus* and its effect on bivalve behavior and physiology[J]. *Environmental Toxicology*, 2004, 19(2): 143-153.
- [16] Anacleto P, Maulvault A L, Barrento S, et al. Physiological responses to depuration and transport of native and exotic clams at different temperatures[J]. *Aquaculture*, 2013, 408-409: 136-146.
- [17] Li Q, Zhang F, Wang M X, et al. Effects of hypoxia on survival, behavior, and metabolism of Zhikong scallop *Chlamys farreri* Jones et Preston 1904[J]. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2020, 38(2): 351-363.
- [18] Hégaret H, Brokordt K B, Gaymer C F, et al. Effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* on histopathological and escape responses of the Northern scallop *Argopecten purpuratus*[J]. *Harmful Algae*, 2012, 18: 74-83.
- [19] Artigaud S, Lacroix C, Pichereau V, et al. Respiratory response to combined heat and hypoxia in the marine bivalves *Pecten maximus* and *Mytilus* spp[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2014, 175: 135-140.
- [20] Mayzaud P. Respiration and nitrogen excretion of zooplankton. II. Studies of the metabolic characteristics of starved animals[J]. *Marine Biology*, 1973, 21(1): 19-28.
- [21] Greenway S C, Storey K B. The effect of prolonged anoxia on enzyme activities in oysters (*Crassostrea virginica*) at different seasons[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1999, 242(2): 259-272.
- [22] Lushchak V I, Bagnyukova T V, Lushchak O V, et al. Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2005, 37(6): 1319-1330.
- [23] Chen J H, Mai K S, Ma H M, et al. Effects of dissolved oxygen on survival and immune responses of scallop (*Chlamys farreri* Jones et Preston)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 22(3): 272-281.

- [24] Laudien J, Schiedek D, Brey T, et al. Survivorship of juvenile surf clams *Donax serra* (Bivalvia, Donacidae) exposed to severe hypoxia and hydrogen sulphide[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2002, 271(1): 9-23.
- [25] Ivanina A V, Nesmelova I, Leamy L, et al. Intermittent hypoxia leads to functional reorganization of mitochondria and affects cellular bioenergetics in marine molluscs[J]. Journal of Experimental Biology, 2016, 219(11): 1659-1674.
- [26] Aguirre-Velarde A, Jean F, Thouzeau G, et al. Feeding behaviour and growth of the Peruvian scallop (*Argopecten purpuratus*) under daily cyclic hypoxia conditions[J]. Journal of Sea Research, 2018, 131: 85-94.
- [27] Larade K, Storey K B. A profile of the metabolic responses to anoxia in marine invertebrates[M]//Cell and Molecular Response to Stress. Amsterdam: Elsevier, 2002: 27-46.
- [28] Pillet M, Dupont-Prinet A, Chabot D, et al. Effects of exposure to hypoxia on metabolic pathways in northern shrimp (*Pandalus borealis*) and Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*)[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2016, 483: 88-96.

Behavioral characteristics and physiological responses to hypoxic stress in *Patinopecten yessoensis*

XIA Yuying^{1,2}, ZHANG Jihong², LIU Yi²

1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071, China

Abstract: This study outlines the effects of hypoxia stress on the behavior, physiology, immunity function, and key respiratory enzymes of *Patinopecten yessoensis*. To accomplish this, four dissolved oxygen (DO) gradients [1 mg/L, 2 mg/L, 4 mg/L, and 7 mg/L (control group)] were set to determine the behavioral characteristics (the degree of opening and closing of the shell), oxygen consumption rate, ammonia excretion rate, and the activity levels of antioxidant enzymes (SOD, CAT) and respiratory enzymes (LDH and PK). The results were as follows: (1) The survival rate of *Patinopecten yessoensis* decreased with the decrease in DO concentration; when DO was 1.0 mg/L, the survival rate was only 55%. At 1 mg/L, 2.0 mg/L, and 4.0 mg/L dissolved oxygen concentration, the median lethal time of the scallops was $LT_{50}=95.97$ h, $LT_{50}=147.37$ h, and $LT_{50}=209.58$ h, respectively. (2) The behavioral characteristics of the scallops were divided into five grades numbered from 0 to 4; the higher the score, the better the scallop's state. From the quantitative indicators of scallop behavioral characteristics, the lower the concentration of DO, the lower the score and the worse the state of the scallops. (3) Hypoxic stress had significant effects on the oxygen consumption rate and ammonia excretion rate of the scallops ($P<0.05$) under the stress of $DO\leq 2$ mg/L. When the molar ratio of oxygen to nitrogen was <7 , the energy supply of the scallops was mainly protein; whereas when the DO was ≥ 4 mg/L, the scallops were mainly sustained by protein and fat oxidation. (4) Hypoxia stress significantly affected the level of SOD, CAT, and respiratory enzymes ($P<0.05$) in Yesso scallops. Being under 24-h hypoxia stress increased the concentration of reactive oxygen species (ROS) in the hepatopancreas and adductor muscle. After 48–96 h of hypoxia stress, the activity levels of the SOD and CAT enzyme began to decrease. The metabolic pathways are different under different concentrations of dissolved oxygen. The study has found that when $DO=2$ mg/L, the metabolism associated with aerobic respiration is converted to the glucose-pyruvate-lactic acid respiratory pathway and when $DO=1$ mg/L, the respiratory metabolic pathway may give priority to the glucose-succinate acid pathway. On physiological and biochemical levels, the decrease in immune function and the change in respiratory metabolic pathways may cause the changes in scallop behavior.

Key words: *Patinopecten yessoensis*; hypoxic; physiology; antioxidant enzymes; respiratory key enzyme

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