

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16266

不同个体大小和环境因子对瘤背石磺水中耗氧率及皮肤特性的影响

张明明, 乔帼, 李强, 徐晨, 张凯琦, 黄金田

盐城工学院 海洋与生物工程学院, 江苏 盐城 224051

摘要: 本研究设定了 3 种不同规格, 以及温度(15℃、20℃、25℃和 30℃)、盐度(5、15、25、35 和 45)和 pH(7.5、7.8、8.1 和 8.4) 3 种主要环境因子, 通过测定瘤背石磺(*Onchidium struma*)耗氧率和呼吸器官组织结构的变化研究了其对瘤背石磺呼吸的影响。结果显示, 个体较小的瘤背石磺的耗氧率显著高于个体较大的瘤背石磺, 且温度、盐度和 pH 对瘤背石磺的呼吸均有显著影响($P<0.05$)。在低于 25℃时, 瘤背石磺的耗氧率和黏液腺长短径随温度的升高而增大, 并在 25℃时出现峰值; 高于 25℃后, 耗氧率和黏液腺长短径随之减小; 表皮厚度的变化趋势与其相反; 每 0.1 cm² 皮肤所含颗粒腺数目及长短径变化规律不明显。盐度组各项指标的变化规律或趋势与温度组相似, 峰值出现在盐度 15。pH 实验组中, 耗氧率和黏液腺长短径随着 pH 的增加而增加, 表皮厚度和颗粒腺长短径却在减小, 每 0.1 cm² 皮肤所含颗粒腺数目先增大, 在 pH 8.1 时达到最高值, 随后急剧减少。随着时间的增加, 各影响因子对瘤背石磺的呼吸强度均减小。由此得出, 在水下, 环境因子对瘤背石磺皮肤呼吸具有显著影响, 在 25℃、盐度 15 和 pH 8.1 时, 呼吸代谢良好; 而在 15℃、盐度 45 和 pH 7.5 时, 呼吸代谢受到严重胁迫, 这为深入揭示瘤背石磺呼吸机制、物种保护和人工增殖奠定基础。

关键词: 瘤背石磺; 个体大小; 环境因子; 耗氧率; 皮肤特性

中图分类号: S96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)04-0718-09

瘤背石磺(*Onchidium struma*), 俗名“土海参”, 又叫海癞子等, 隶属于软体动物门(Mollusca), 石磺科(Onchidiidae)^[1], 是中国特有的物种, 主要分布在江、浙、沪沿海地区高潮带的岩礁、大米草滩、芦苇丛、红树林等湿地^[2]。瘤背石磺多数栖息在盐度较低的河口区域, 对湿度要求较高^[3]。瘤背石磺营养价值丰富, 含有 20 多种氨基酸以及多种人体需要的微量元素^[4-5], 是一种亟待进一步开发利用的经济水产品。但近年来, 由于我国大规模围海造地和过度开发, 破坏了瘤背石磺栖息的生态环境, 造成种群数量迅速下降。因此, 有关瘤背石磺物种保护、生态修复以及增殖研究显得十分迫切和重要^[5]。

呼吸代谢作为生物能量学和动物生理学研究

的主要内容之一, 受到了生物学家们的广泛关注, 并且由此引出的能量消耗与平衡、营养需求等问题也受到了诸多关注。水生动物大多数在水中呼吸, 所以必须从水体中得到氧气。另外, 在环境条件基本保持稳定的情况下水体中的溶氧量也是基本不变的, 因此, 便可测出动物在水体中的耗氧量或耗氧率。耗氧率是研究呼吸代谢的重要指标之一, 它由自身内在因素和外界环境因子共同调节。早在 20 世纪初, Zuntz 等^[6]就已经在呼吸代谢以及对耗氧率的测定方法等方面进行了研究。随后许多专家们又分别研究了鲤(*Cyprinus carpio*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鲫(*Carassius auratus*)、鳊(*Parabramis pekinensis*)、鳗鲡(*Anguilla japonica*)及双壳贝类等

收稿日期: 2016-09-04; 修订日期: 2016-10-24.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31470130); 江苏省海洋滩涂生物化学与生物技术重点实验室开放项目(K2016-15).

作者简介: 张明明(1982-), 男, 讲师, 博士, 主要从事水产养殖和海洋生物学方面的研究. E-mail: zhangmingm44ok@163.com

通信作者: 黄金田, 教授. E-mail: hjt@ycit.cn

多种水生动物的呼吸代谢^[7-10]。并且, 在研究贝类的呼吸代谢或者能量消耗水平时, 通常也以耗氧率作为一个重要指标, 因为耗氧率的大小及变化可以很大程度上反映出贝类的代谢水平及生物机体的变化规律^[11]。

国内外关于瘤背石磺的报道主要集中于繁殖生物学^[12-13]、发育生物学^[14]、神经生物学^[15]、分子生物学^[16]、营养学^[4]及增养殖技术^[17]等内容, 但关于瘤背石磺呼吸生理方面的研究相对甚少。管菊等^[18]研究了4种石磺在水中的耗氧情况, 结果表明它们的表皮呼吸耗氧率均随着体重的增加而降低; 水下3 h时耗氧率达最低值; 经石蜡密封处理相同水下条件下(温度22℃, 盐度30), 瘤背石磺耗氧率低于紫色疣石磺(*Peronia verruculata*), 高于里氏拟石磺(*Paraoncidium reevesii*)和平疣桑槲石磺(*Platevindex mortoni*)。

瘤背石磺的发育过程历经面盘幼虫期, 呼吸方式兼有皮肤呼吸和呼吸腔呼吸, 被专家学者推断为由海生向陆生过渡的代表性滩涂贝类^[5], 被认为是一种进化的贝类, 也是研究海洋生物向陆地进化的重要模式生物。当瘤背石磺处于水下或在陆上静止不动时, 表皮呼吸起主导作用, 气孔是关闭的; 而在陆上或在爬行过程中, 其外套膜后部向上抬起, 暴露出打开的肺孔以辅助呼吸, 并且推测肺囊可能是仅在石磺离开水体后活动的附属呼吸器官^[17]。本文通过研究瘤背石磺水下皮肤的呼吸代谢及其与各种非生物因素的相互关系, 为进一步掌握其代谢特征、生理状况、营养需求水平以及对外界环境条件的适应能力等奠定基础, 为瘤背石磺的人工增养殖和移植驯化提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验用瘤背石磺采集于江苏省盐城市射阳县新洋港附近沿海滩涂区域, 采集区滩涂表面积水温度25℃, 盐度20, pH 8.0。实验前用150 mg/L KMnO₄溶液对其体表消毒5 min, 然后放置于用海泥铺设、瓦片搭建的模拟自然环境的饲养箱院(70 cm×50 cm×40 cm)内暂养驯化3 d, 并适量喷

洒人工海水保持湿度^[18]。

1.2 实验方法

将调配的人工海水加入2 L玻璃烧杯中, 塑料导管插入至烧杯底部, 并用燕尾夹夹住塑料导管以防气体进入; 放入实验动物后, 用液体石蜡将液面封住, 并用保鲜膜多层封住烧杯口以防瘤背石磺逃逸。人工海水主要由海水素(青岛海大通用海水素有限公司, 主要成分为65% NaCl和15% MgSO₄)和曝气暴晒的自来水配置而成, 人工配制海水的盐度为20, pH为8.0, 这与现场采样时滩涂积水指标相近。本实验共设置了不同规格瘤背石磺, 并分析不同温度、盐度和pH条件下中规格瘤背石磺耗氧率的变化。

1.2.1 个体大小对瘤背石磺呼吸的影响 分别挑选小、中、大3种规格活力较好的瘤背石磺[小: (3.19±0.63) g; 中: (6.11±0.68) g; 大: (10.49±2.04) g], 置于如上设定好的装有人工海水的玻璃烧杯中进行实验。实验期间, 温度维持在25℃, 海水盐度为20和pH为8.0, 每组设置4个重复, 每个烧杯中放置5只瘤背石磺, 未放瘤背石磺的海水组作为空白对照组。

1.2.2 环境因子对瘤背石磺呼吸的影响 温度对瘤背石磺呼吸的影响: 实验设置15℃、20℃、25℃和30℃四个温度梯度, 温度由空调和水浴锅共同调控。实验海水的盐度为20, pH为8.0, 每个温度组设置4个重复, 每个烧杯中放5只中规格[(6.11±0.68) g]的瘤背石磺。

盐度对瘤背石磺呼吸的影响: 实验设置盐度5、15、25、35和45五个梯度, 实验海水pH为8.0, 水温为25℃。每个盐度梯度组设置4个重复, 每个烧杯中放5只中规格瘤背石磺。

pH对瘤背石磺呼吸的影响: 实验设置pH 7.5、7.8、8.1和8.4四个梯度, pH由Na₂HPO₄、NaH₂PO₄等共同调节, 实验海水的盐度为20, 水温为25℃。每个pH梯度组设置4个重复, 每个烧杯中放5只中规格瘤背石磺。

如上温度、盐度和pH实验组中, 均以未放瘤背石磺的海水组作为空白对照组。实验过程中仔细观察、记录各组瘤背石磺的活动和存活状况。

1.3 样品采集及处理

放入实验动物前抽取水样,测其溶氧量作为初始溶氧值。实验过程中,50 mL 注射器经排空后,通过插入预先设置的塑料导管抽取水样,暂保离心管后立即测其溶氧。每隔 1 h 抽取一次水样,共 5 次。实验结束后,拆除装置,取出实验动物,解剖取其相同部位皮肤组织,用 Bouin's 液固定于青霉素小瓶中,贴上标签待用。

水样处理:抽取出的水样用 SD150 型 pH/EC/DO 多参数测定仪(华东理工大学研制)测定其溶氧量,记录并用以下公式计算耗氧率:

$$R_0 = [\text{DO}_1 - \text{DO}_2 - (\text{DO}_3 - \text{DO}_4)] \times V / (T \times M)$$

式中, R_0 为瘤背石磺耗氧率 [$\mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{h})$]; DO_1 和 DO_2 分别表示实验组实验前后的溶解氧 (mg/L); DO_3 和 DO_4 分别表示空白组实验前后的溶解氧 (mg/L); V 为实验水体体积 (mL); T 为实验时间 (h); M 为实验瘤背石磺总鲜重 (g)。

组织样品处理:已固定的组织样品制成石蜡切片,通过 Nikon Eclipse Ni M570 E 显微镜进行观察,借助 NIS-Elements D 软件测量并拍照。为对比分析不同环境因子对皮肤组织结构相关指标的影响,每组样品随机抽取 6 个切片进行观察测量,每个切片随机测量 6 个位点处的皮肤厚度并计数每 0.1 cm^2 皮肤所含颗粒腺的数量,同时测量颗粒腺的长短径和黏液腺的长短径。

1.4 数据统计与分析

原始数据经 Excel 2010 初步整理后,采用 SPSS 21.0 软件对数据做方差齐性分析,然后,进行单因子方差分析(One-Way ANOVA),并对差异显著组进行 Fisher's LSD 多重比较。 $P < 0.05$ 为差异显著。所有数据均以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm \text{SD}$) 的形式表示。

2 结果与分析

2.1 个体大小和环境因子对瘤背石磺耗氧率的影响

2.1.1 个体大小对瘤背石磺耗氧率的影响 瘤背石磺耗氧率随个体增大而减小,不同个体大小瘤背石磺间耗氧率的差异显著 ($P < 0.05$); 同一规格瘤背石磺的耗氧率随着时间延续而降低(图 1)。大、中、小规格的瘤背石磺耗氧率从 1 h 时的 $0.33 \mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{h})$ 、

$0.72 \mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{h})$ 和 $1.26 \mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{h})$ 分别降至 5 h 时的 $0.16 \mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{h})$ 、 $0.31 \mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{h})$ 和 $0.61 \mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{h})$ 。

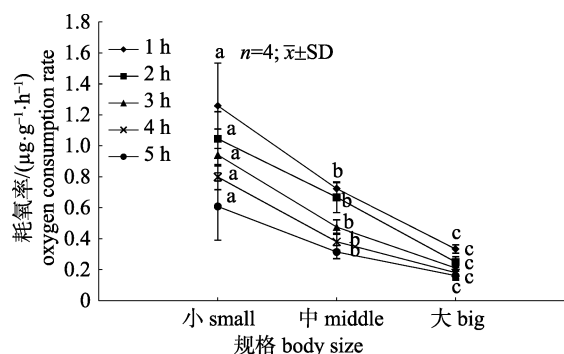


图 1 个体大小对瘤背石磺耗氧率的影响

小: $(3.19 \pm 0.63) \text{ g}$; 中: $(6.11 \pm 0.68) \text{ g}$; 大: $(10.49 \pm 2.04) \text{ g}$ 。
不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 1 Effect of individual size on the oxygen consumption rate of *Onchidium struma*

small: $(3.19 \pm 0.63) \text{ g}$; middle: $(6.11 \pm 0.68) \text{ g}$;
big: $(10.49 \pm 2.04) \text{ g}$.

Values with different letters mean significant difference ($P < 0.05$).

2.1.2 温度对瘤背石磺耗氧率的影响 如图 2 所示,在水温低于 25°C 时,瘤背石磺的耗氧率随温度的升高而逐渐增加, 25°C 时耗氧率达到最高值 [$1.13 \mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{h})$]; 高于 25°C 后,耗氧率呈现了下降的趋势。1 h 时, 25°C 组与 15°C 、 20°C 和 30°C 组间差异显著 ($P < 0.05$), 15°C 、 20°C 和 30°C 组间差异不显著 ($P > 0.05$); 2 h、3 h、4 h 和 5 h 时, 15°C 和 20°C

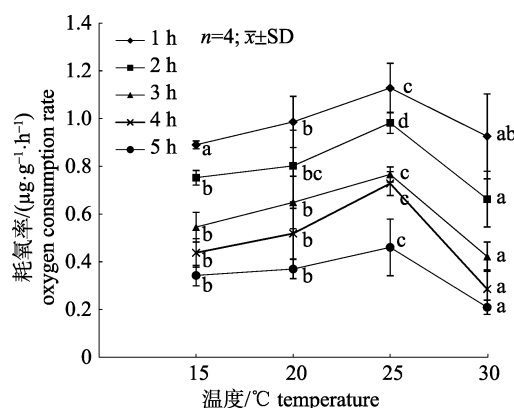


图 2 温度对瘤背石磺耗氧率的影响

样本体重 $(6.11 \pm 0.68) \text{ g}$ 。不同小写字母表示温度组间差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 2 Effect of water temperature on the oxygen consumption rate of *Onchidium struma*

Body weight of *O. struma* $(6.11 \pm 0.68) \text{ g}$. Values with different letters mean significant difference ($P < 0.05$).

组间差异不显著($P>0.05$), 其余各温度组间差异均显著($P<0.05$)。并且, 随着时间的增加, 各温度组的耗氧率均降低。

2.1.3 盐度对瘤背石磺耗氧率的影响 瘤背石磺的耗氧率随着盐度的增加而升高, 在盐度为 25 时上升至最高值[1.04 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$], 随后又逐渐降低(图 3)。1 h 时, 盐度 15 组和盐度 25 组间差异不显著, 均显著高于其他盐度组($P<0.05$); 2 h 时, 各盐度组耗氧率差异均显著; 3 h 和 4 h 时, 除盐度 5 组和盐度 45 组、盐度 25 组和盐度 35 组耗氧率差异不显著外, 其余组差异均显著($P<0.05$)。5 h 时, 盐度 5 组和盐度 15 组耗氧率差异不显著($P>0.05$), 盐度 35 和盐度 45 组耗氧率差异不显著($P>0.05$), 盐度 25 组显著高于其他组。另外, 在盐度为 5 和 45 时, 2 h 和 3 h 耗氧率变化随时间变化显著, 其余不显著; 而盐度为 15、25 和 35 时, 随着时间的增加, 耗氧率显著降低。

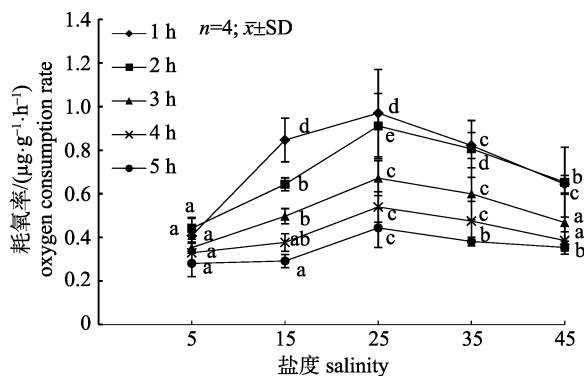


图3 盐度对瘤背石磺耗氧率的影响

样本体重 (6.11 ± 0.68) g. 不同小写字母表示盐度组间差异显著 ($P<0.05$).

Fig. 3 Effect of salinity on the oxygen consumption rate of *Onchidium struma*

Body weight of *O. struma* (6.11 ± 0.68) g. Values with different letters mean significant difference ($P<0.05$).

2.1.4 pH 对瘤背石磺耗氧率的影响 在 pH 为 7.5~8.1 时瘤背石磺的耗氧率随 pH 的增加而增加, 在 pH 为 8.1 时达到最高值[1.30 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$], 之后稍有下降(图 4)。1 h 时, 耗氧率在组间差异显著($P<0.05$); 2 h 时, pH 7.5 组的耗氧率显著低于其他组($P<0.05$); 3 h、4 h 和 5 h 时, pH 8.1 组显著高于其他组。随着时间的增加, 各 pH 组耗氧率变化显著, 呈下降趋势, 且在 pH 8.1 时差异极为显著($P<0.01$)。

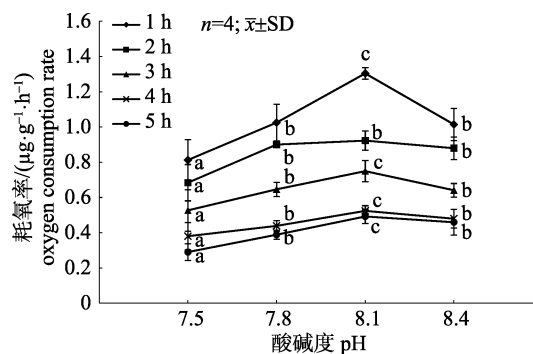


图4 pH 对瘤背石磺耗氧率的影响

样本体重 (6.11 ± 0.68) g. 不同小写字母表示 pH 组间差异显著 ($P<0.05$).

Fig. 4 Effect of pH on the oxygen consumption rate of *Onchidium struma*

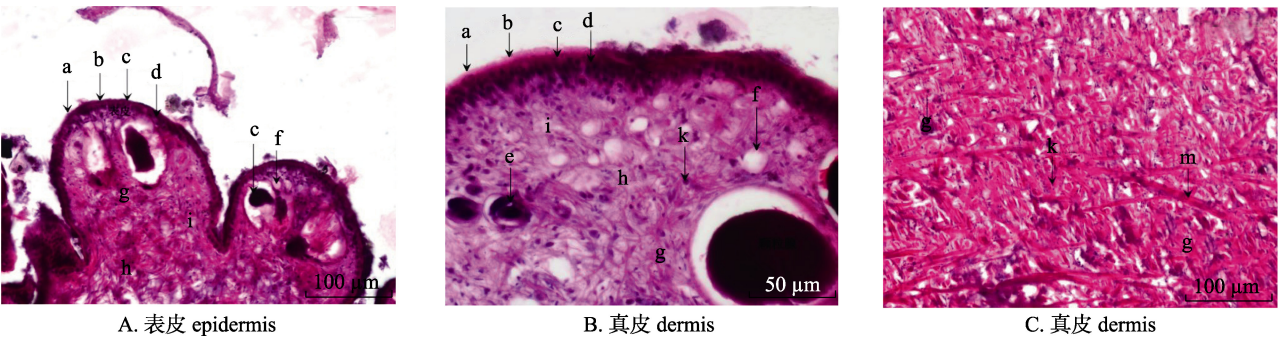
Body weight of *O. struma* (6.11 ± 0.68) g. Values with different letters mean significant difference ($P<0.05$).

2.2 环境因子对瘤背石磺皮肤组织结构的影响

2.2.1 瘤背石磺皮肤组织结构观察 瘤背石磺皮肤主要由角质膜、表皮和真皮三部分组成, 皮肤腺体包括颗粒腺和黏液腺(图 5A)。表皮由多层上皮细胞构成, 根据各层细胞的形态结构和功能, 从外向内依次为角质层、颗粒层和生发层(图 5B)。真皮内外分别为致密层和疏松层(图 5)。

2.2.2 温度对瘤背石磺皮肤组织结构的影响 温度对瘤背石磺表皮厚度、黏液腺和颗粒腺长短径影响见表 1。25℃组表皮厚度显著低于其他温度组, 黏液腺长短径显著高于其他组($P<0.05$)。各温度组间颗粒腺数目变化较大, 组间差异显著($P<0.05$), 但相关规律不明显。颗粒腺长短径随温度增加而减小, 25℃组、30℃组和 15℃组、20℃组间差异极显著($P<0.01$)。

2.2.3 盐度对瘤背石磺皮肤组织结构的影响 瘤背石磺的表皮厚度随着盐度的增加先减小后增大, 盐度为 15 时表皮厚度最薄[(10.63 $\pm$ 1.97) μm], 显著低于盐度 5 组、盐度 35 组和盐度 45 组($P<0.05$)。盐度为 15 时黏液腺的长短径均显著高于其他盐度组($P<0.05$)。颗粒腺数在各组间没有明显的差异; 颗粒腺长径在盐度为 5 时最大[(71.14 $\pm$ 24.32) μm], 盐度 15 时最小[(45.85 $\pm$ 7.26) μm], 并与其他盐度组差异显著($P<0.05$); 颗粒腺短径在盐度为 15 时最小[(35.17 $\pm$ 7.78) μm], 显著小于其他组, 盐度为 45 时最大[(52.64 $\pm$ 9.75) μm] (表 2)。



A. 表皮 epidermis B. 真皮 dermis C. 真皮 dermis

图 5 瘤背石磺的皮肤组织结构(HE)

a: 角质膜; b: 角质层; c: 颗粒层; d: 生发层; e: 色素细胞; f: 黏液层; g: 真皮;
h: 疏松层; i: 致密层; j: 血窦; k: 钙颗粒; m: 肌纤维.

Fig. 5 Skin histology of *Onchidium struma* (HE)

a: cuticle; b: cuticle layer; c: granular layer; d: germinal layer; e: pigment cell; f: grume layer; g: dermis;
h: tectorium; i: compact layer; j: blood sinus; k: Ca granule; m: muscle fiber.

表 1 温度对瘤背石磺皮肤表皮厚度、腺体数目及大小的影响

Tab. 1 Effect of temperature on the epidermis thickness, number and size of glands in *Onchidium struma* skin

$n=6; \bar{x} \pm SD$

指标 item	水温/℃ water temperature			
	15	20	25	30
表皮厚度/μm epidermis thickness	14.61±5.16 ^a	16.33±7.41 ^a	10.64±2.29 ^b	12.53±2.50 ^{ab}
黏液腺长径/μm long diameter of mucus gland	8.61±0.86 ^a	11.27±3.08 ^c	15.61±2.94 ^d	9.45±2.16 ^b
黏液腺短径/μm short diameter of mucus gland	8.04±1.39 ^a	8.54±0.89 ^a	10.47±2.41 ^b	9.37±2.47 ^a
颗粒腺数/(ind·10 ⁻¹ ·cm ⁻²) number of granular gland	9.28±4.07 ^c	4.19±2.13 ^a	6.76±2.12 ^{bc}	5.37±1.32 ^{ab}
颗粒腺长径/μm long diameter of granular gland	54.13±9.45 ^b	48.60±13.93 ^b	38.94±8.04 ^{ab}	33.30±9.65 ^a
颗粒腺短径/μm short diameter of granular gland	45.98±8.14 ^b	42.91±8.72 ^b	32.29±19.01 ^{ab}	25.09±12.43 ^a

注：每行内具不同上标表示同一测定指标在不同实验组间差异显著($P \leq 0.05$).

Note: Values with the different superscripts within the same row are significantly different for the same item among different groups ($P \leq 0.05$).

表 2 盐度对瘤背石磺皮肤表皮厚度、腺体数目及大小的影响

Tab. 2 Effects of salinity on the epidermis thickness, number and size of glands in *Onchidium struma* skin

$n=6; \bar{x} \pm SD$

指标 item	盐度 salinity				
	5	15	25	35	45
表皮厚度/μm epidermis thickness	14.31±5.93 ^{bc}	10.63±1.97 ^a	14.24±5.02 ^{ab}	15.63±4.62 ^{bc}	16.70±3.23 ^d
黏液腺长径/μm long diameter of mucus gland	15.08±6.69 ^a	17.99±2.57 ^d	16.99±3.82 ^c	15.27±2.60 ^b	16.19±1.19 ^c
黏液腺短径/μm short diameter of mucus gland	11.34±2.14 ^a	14.31±3.17 ^c	12.27±2.18 ^b	11.79±6.05 ^b	12.65±2.86 ^b
颗粒腺数/(ind·10 ⁻¹ ·cm ⁻²) number of granular gland	6.120±2.07 ^a	6.36±3.12 ^a	7.14±2.00 ^a	7.37±3.21 ^a	7.52±2.13 ^a
颗粒腺长径/μm long diameter of granular gland	71.14±24.32 ^c	45.85±7.26 ^a	56.95±21.52 ^{ab}	51.84±15.14 ^{ab}	65.46±18.30 ^{bc}
颗粒腺短径/μm short diameter of granular gland	43.79±7.69 ^b	35.17±7.78 ^a	42.15±10.05 ^b	41.98±15.97 ^b	52.64±9.75 ^c

注：每行内具不同上标表示同一测定指标在不同实验组间差异显著($P \leq 0.05$).

Note: Values with the different superscripts within the same row are significantly different for the same item among different groups ($P \leq 0.05$).

2.2.4 pH 对瘤背石磺皮肤组织结构的影响 pH 为 7.5~8.1 时, 瘤背石磺表皮厚度随 pH 增加逐渐减低, 在 pH 为 8.4 时稍有增加。黏液腺长短径随 pH 增加而增加, pH 为 8.4 时分别为(14.31±3.17) μm 和(11.87±3.34) μm, pH 为 8.1 时颗粒腺数[(8.25±1.17) ind/(10·cm²)]显著高于其他 pH 组, 颗粒腺长

短径随着 pH 升高而减小(表 3)。

3 讨论

3.1 个体大小对瘤背石磺呼吸的影响

体重是影响动物呼吸代谢的重要因素之一。本研究表明, 个体较小的瘤背石磺水中耗氧率相对

表 3 pH 对瘤背石磺皮肤表皮厚度、腺体数目及大小的影响
Tab. 3 Effect of pH on the epidermis thickness, number and size of glands in *Onchidium struma* skin

n=6; $\bar{x} \pm SD$

指标 item	pH			
	7.5	7.8	8.1	8.4
表皮厚度/ μm epidermis thickness	16.10 $\pm$ 4.05 ^a	15.74 $\pm$ 3.96 ^a	13.93 $\pm$ 4.39 ^b	14.13 $\pm$ 3.47 ^b
黏液腺长径/ μm long diameter of mucus gland	12.1 $\pm$ 3.15 ^a	12.12 $\pm$ 2.66 ^a	13.33 $\pm$ 2.82 ^b	14.31 $\pm$ 3.17 ^c
黏液腺短径/ μm short diameter of mucus gland	9.06 $\pm$ 1.82 ^a	9.34 $\pm$ 1.81 ^a	10.79 $\pm$ 2.06 ^b	11.87 $\pm$ 3.34 ^c
颗粒腺数/(ind $\cdot 10^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) number of granular gland	4.07 $\pm$ 1.00 ^a	6.31 $\pm$ 2.14 ^b	8.25 $\pm$ 1.17 ^c	4.08 $\pm$ 3.23 ^a
颗粒腺长径/ μm long diameter of granular gland	60.21 $\pm$ 24.68 ^c	49.35 $\pm$ 19.93 ^b	48.90 $\pm$ 11.81 ^b	45.30 $\pm$ 15.45 ^a
颗粒腺短径/ μm short diameter of granular gland	42.36 $\pm$ 18.34 ^b	41.92 $\pm$ 9.46 ^b	33.93 $\pm$ 12.79 ^a	33.32 $\pm$ 11.32 ^a

注: 每行内具不同上标表示同一测定指标在不同实验组间差异显著($P<0.05$).
Note: Values with the different superscripts within the same row were significantly different for the same item among different groups ($P<0.05$).

较大, 而个体较大的瘤背石磺的耗氧率则相对较小, 即瘤背石磺耗氧率随着个体的增大而减小, 与管菊等^[18]在 4 种石磺水中呼吸耗氧研究中的结论一致, 即单位体重的耗氧率与石磺个体大小成反比, 这与瘤背石磺不同生长发育阶段的生理特性相关。个体小的瘤背石磺正处于生长发育旺盛阶段, 机体基础代谢率高, 因而耗氧率也高。另外, 随着时间增加, 各规格瘤背石磺的耗氧率在相对减小, 这可能与瘤背石磺随着时间的增加而适应了新环境有关。

3.2 温度对瘤背石磺呼吸的影响

水温对动物机体的生命活动具有显著影响。随着温度升高, 动物机体的代谢水平提高, 其活动强度也会增大, 那么相应的呼吸强度也会增大。这主要是因为随着水温升高, 维持生命所需的重要组织器官的活性不断增强, 各种酶的活性提高。本研究表明, 随着温度的增加, 瘤背石磺的耗氧率逐渐增加, 在 25℃时达到最高值, 25℃之后, 耗氧率又呈下降趋势。这种变化趋势与瘤背石磺适宜生活温度(23~28℃)有关。在 23~28℃时, 瘤背石磺的活力较旺盛, 摄食和代谢较好, 耗氧率较高, 超过最适温度后, 一些机能性代谢开始下降, 呼吸强度和耗氧率降低, 这与仿刺参(*Apostichopus japonicus*)的研究结果类似^[19]。仿刺参的耗氧率在 20℃前呈明显的上升趋势, 并在 20℃时达到最高值, 在 20℃之后缓慢下降。但两个物种出现耗氧率峰值对应的温度不同, 这是由仿刺参与瘤背石磺最适生长温度不同而致。另外, 随

着时间的增加, 瘤背石磺的耗氧率逐渐降低, 体现了适温范围内随着时间增加, 瘤背石磺逐渐适应了新的环境, 安逸下来, 呼吸强度相应的降低; 而适温范围之外, 则是由于不能适应此温度而出现机能不断下降的情况。此外, 随着实验的进行水中溶解氧逐渐减低可能会对此结果产生一定的影响。

表皮厚度、黏液腺长短径和颗粒腺长短径均受温度影响。呼吸强度增加时, 皮肤拉伸, 表皮变薄, 增大其与空气的接触面积, 便于呼吸代谢; 黏液腺的分泌物可以维持皮肤表面湿润黏滑, 利于气体交换和离子运输, 并减少水下动物机体皮肤与水间的摩擦力, 故黏液腺的大小可以反映呼吸强度的大小。本研究表明, 适宜生长温度范围内, 随着温度的增加, 瘤背石磺呼吸强度增加, 表皮厚度反而减小, 黏液腺长短径增大; 超出适宜生长温度范围后, 则相反。25℃时, 表皮厚度最小, 黏液腺长短径最长, 这与瘤背石磺的适宜生长温度最接近, 此时, 呼吸代谢最强。相对于黏液腺, 颗粒腺的分泌物主要润滑机体减小阻力和防御敌害、与呼吸相关性没有黏液腺高。本研究显示黏液腺数目及大小与温度的变化规律尚不明显。

3.3 盐度对瘤背石磺呼吸的影响

饶科等^[20]研究了不同盐度对 3 种南方贝类呼吸率的影响, 结果表明, 盐度为 20~35 时近江牡蛎(*Crassostrea rivularis*)的呼吸率随盐度的升高而降低, 而翡翠贻贝(*Perna viridis*)和波纹巴非蛤

(*Paphia undulata*) 在盐度为 20~30 时, 呼吸率随盐度的升高而升高; 而在盐度为 30~35 时, 则随盐度的升高而下降, 这与不同地域不同贝类的最适盐度不同有关。本研究探讨了盐度 5、15、25、35 和 45 对瘤背石磺耗氧率的影响, 结果显示, 瘤背石磺的耗氧率随盐度的增加而升高, 在盐度为 15 时达到最高值, 随后随着盐度的升高又逐渐降低, 这种变化趋势与翡翠贻贝和波纹巴非蛤耗氧率的变化规律相同。瘤背石磺的盐度适应范围较广(5~35), 最适盐度为 10 左右, 因而出现了上述的实验结果, 在该范围内随盐度升高而升高, 但当盐度超过最适盐度时, 其呼吸率也会出现下降。另外, 随着时间的增加, 各盐度组的耗氧率也逐渐降低, 其原因与温度相似。

对比分析不同盐度条件对皮肤组织结构相关指标的影响显示, 随着盐度的增加, 瘤背石磺的表皮厚度先减小后增大, 最低值出现在盐度 15 组; 黏液腺的长短径随着盐度增加而增加, 在盐度为 15 时达到最高, 随后随着盐度增加又逐渐降低, 在盐度为 45 时又稍有上升; 颗粒腺长短径随盐度增加而减小, 在盐度为 15 之后又上升。说明了瘤背石磺的水中呼吸强度受水域盐度影响, 盐度为 15 时耗氧率最高, 与盐城地区瘤背石磺栖息地的盐度接近。瘤背石磺的表皮厚度和颗粒腺长短径的变化趋势与呼吸代谢强度相反, 与瘤背石磺的呼吸代谢有一定的相关性。盐度为 45 时, 机体受到了高盐胁迫, 黏液腺分泌更多的黏液以利于气体交换。

3.4 pH 对瘤背石磺呼吸的影响

张明亮等^[21]研究发现, 在 pH 为 7.0~8.1 时, 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)呼吸率随着 pH 的降低而显著下降。本研究表明, 瘤背石磺的耗氧率随着 pH 的增加而增加, 在 pH 为 8.1 时达到最高值, 之后稍有下降, 但不明显, 这可能与较低或较高 pH 抑制了瘤背石磺新陈代谢相关酶的酶活有关。此外, 低 pH 使海水酸化, 将导致海水渗透压发生变化, 使得瘤背石磺需要用来维持渗透压调节的能量增加, 从而使其用于呼吸等其他生理活动的能量有所下降, 但瘤背石磺对酸化具有一定程度的抵抗和调节能力, 所以 pH 为 7.5~7.8 时各指标

间差异并不显著。随着时间的增加各 pH 组耗氧率变化呈显著下降趋势。

表皮厚度随着 pH 的增大而减小, 在 pH 为 8.1 时达到最小值, 随后又稍有增加; 黏液腺长短径随 pH 增加而增加, 这与上述瘤背石磺的适宜酸碱度—pH 8.1 时呼吸强度最强相一致。pH 8.1 组颗粒腺数显著高于其他 pH 组, 说明 pH 的改变可以影响瘤背石磺颗粒腺数目的变化, 进而影响其呼吸强度。颗粒腺长短径随着 pH 的升高而减小, 由此推测, 颗粒腺长短径的改变除了与呼吸强度有关外, 还与渗透压变化有关。

参考文献:

- [1] Cheng Z Q, Shen H D, Yao L X, et al. Effects of drying methods on antioxidant activities and reducing capacity of polysaccharides extracted from *Onchidium struma*[J]. Food Machinery, 2015, 31(6): 169–172. [程知庆, 沈和定, 姚理想, 等. 干燥方法对瘤背石磺多糖抗氧化性和还原力的影响[J]. 食品与机械, 2015, 31(6): 169–172.]
- [2] Sun B N, Wei L L, Shen H D, et al. Phylogenetic analysis of euthyneuran gastropods from sea to land mainly based on comparative mitogenomic of four species of Onchidiidae (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata)[J]. Mitochondr DNA, 2016, 27(5): 3075–3077.
- [3] Ni X Y, Ying X P. Histological observations of the digestive system of *Onchidium verruculatum*[J]. Sichuan Journal of Zoology, 2009, 28(4): 553–557. [倪小英, 应雪萍. 石磺消化系统的组织学观察[J]. 四川动物, 2009, 28(4): 553–557.]
- [4] He S S, Wu X G, Teng W M, et al. Biochemical composition and nutritional evaluation in the muscle of different size on *Onchidium struma*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(4): 761–767. [贺诗水, 吴旭干, 滕炜鸣, 等. 不同规格瘤背石磺(*Onchidium struma*)肌肉的生化组成及营养价值评价[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(4): 761–767.]
- [5] Huang J T, Wang A M. Determination of the nutrients of *Onchidium struma* and evaluation of its quality[J]. Marine Sciences, 2008, 32(11): 29–35. [黄金田, 王爱民. 瘤背石磺营养成分分析及品质评价[J]. 海洋科学, 2008, 32(11): 29–35.]
- [6] Wang X L. Primary study on mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) larvae's growth, feeding, oxygen consumption and the safe concentration of several medications[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2007. [王小玲. 鳊仔鱼生长摄食、耗氧及药物安全浓度的初步研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007.]

- [7] Fan Z M, Zhao X H, Qian L. Determination of oxygen consumption rate and asphyxia point of *Perca fluviatilis* fry[J]. Journal of Hydroecology, 2009, 30(4): 129–132. [范镇明, 赵新红, 钱龙. 河鲈鱼苗耗氧率和窒息点的测定[J]. 水生生态学杂志, 2009, 30(4): 129–132.]
- [8] Brett J R. The relation of size to rate of oxygen consumption and sustained swimming speed of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*)[J]. J Fish Res Board Can, 2011, 22(6): 1491–1501.
- [9] Rao G M. Oxygen consumption of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in relation to activity and salinity[J]. Can J Zool, 2011, 46(4): 781–786.
- [10] Liu Y, Shi K, Zhang S, et al. Advancement of respiratory metabolism study in bivalve molluscs[J]. South China Fisheries Science, 2007, 3(4): 65–69. [刘勇, 施坤涛, 张少华, 等. 双壳贝类呼吸代谢的研究进展[J]. 南方水产科学, 2007, 3(4): 65–69.]
- [11] Marshall D J, Dong Y W, Mcquaid C D, et al. Thermal adaptation in the intertidal snail *Echinolittorina malaccana* contradicts current theory by revealing the crucial roles of resting metabolism[J]. J Exp Bio, 2011, 214(21): 3649–3657.
- [12] Zhang Y, Wu X F, Shen H D, et al. Preliminary study on mating behavior of *Onchidium struma*[J]. Journal of Biology, 2011, 28(6): 39–42. [张雨, 吴旭峰, 沈和定, 等. 瘤背石磺交配规律的初步研究[J]. 生物学杂志, 2011, 28(6): 39–42.]
- [13] Shen H D, Chen H C, Chen X L, et al. Experimental study on the reproductive biology of *Onchidium* sp.[J]. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(6): 753–760. [沈和定, 陈汉春, 陈贤龙, 等. 石磺繁殖生物学的实验研究[J]. 水产学报, 2006, 30(6): 753–769.]
- [14] Duan X W, Zhao Y L, Zeng C, et al. Effect of mating on development and variation of ovotestis and relevant organs in *Onchidium struma*[J]. Journal of Fisheries of China, 2007, 31(b09): 80–86. [段晓伟, 赵云龙, 曾错, 等. 交配对瘤背石磺两性囊及其相关器官发育与变化的作用[J]. 水产学报, 2007, 31(b09): 80–86.]
- [15] Hatsuo H, Satoru I. Chaotic nature of bursting discharges in the *Onchidium pacemaker neuron*[J]. J Theor Biol, 1992, 156(3): 269–291.
- [16] Wei L L, Shen H D, Zhang Y, et al. Analysis of complete mitochondrial genome of *Onchidium struma* (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata: Onchidiidae)[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(4): 493–500. [魏峦峦, 沈和定, 张雨, 等. 瘤背石磺线粒体基因组全序列分析[J]. 水产学报, 2011, 35(4): 493–500.]
- [17] Shen Y L, Huang J T, Ge X P, et al. Effects of different hatching ways, cultivating densities and incubators on the artificial breeding of *Onchidium struma*[J]. Marine Sciences, 2013, 37(3): 109–116. [沈永龙, 黄金田, 戈贤平, 等. 不同孵化方式、培育密度和附着基对瘤背石磺人工繁育的影响[J]. 海洋科学, 2013, 37(3): 109–116.]
- [18] Guan J, Shen H D, Wang D F, et al. On underwater oxygen consumption rate of four species of Onchidiid[J]. Marine Fisheries, 2014, 36(6): 511–515. [管菊, 沈和定, 王冬凤, 等. 4种石磺水中呼吸耗氧初步研究[J]. 海洋渔业, 2014, 36(6): 511–515.]
- [19] Zhao B, Li C L, Hu W, et al. Effects of low temperature on the growth and oxygen consumption rate of different sizes of sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*) in industrial aquaculture[J]. Marine Sciences, 2011, 35(12): 88–91. [赵斌, 李成林, 胡炜, 等. 低温对不同规格刺参幼参生长与耗氧率的影响[J]. 海洋科学, 2011, 35(12): 88–91.]
- [20] Rao K, Huang M J, Zhang T P, et al. Effects of salinity and pH on respiration and calcification of three kinds of shellfish in southern China[J]. Journal of Hydroecology, 2014, 35(4): 74–80. [饶科, 黄明坚, 章逃平, 等. 盐度与pH对3种南方贝类呼吸率和钙化率的影响[J]. 水生生态学杂志, 2014, 35(4): 74–80.]
- [21] Zhang M L, Zou J, Fang J G, et al. Impacts of marine acidification on calcification, respiration and energy metabolism of Zhikong scallop (*Chlamys farreri*)[J]. Progress in Fishery Sciences, 2011, 32(4): 48–54. [张明亮, 邹健, 方建光, 等. 海洋酸化对栉孔扇贝钙化、呼吸以及能量代谢的影响[J]. 渔业科学进展, 2011, 32(4): 48–54.]

Effect of body size and environmental factors on underwater oxygen consumption rate and skin characteristics of *Onchidium struma*

ZHANG Mingming, QIAO Guo, Li Qiang, XU Chen, ZHANG Kaiqi, HUANG Jintian

School of Marine and Biotechnology, Yancheng Institute of Technology, Yancheng 224051, China

Abstract: *Onchidium struma* is a shell-less pulmonate and lives in the middle and high intertidal zone. It is considered as a commercially important species owing to its high nutritive value and beneficial effects in Chinese medicine. *O. struma* is also regarded as an important representative species for a better understanding of the evolution from aquatic to terrestrial life since this species has two methods of respiration—epidermal respiration and pulmonary respiration. Epidermal respiration plays an important role in the underwater life stage or stationary stage of *O. struma*, while pulmonary respiration contributes to its creeping or terrestrial life stage. In the present study, the effect of body size, water temperature (15°C, 20°C, 25°C, and 30°C), salinity (5, 15, 25, 35, and 45) and pH (7.5, 7.8, 8.1, and 8.4) on underwater oxygen consumption rate (OCR) and epidermal histology was determined to provide valuable information for understanding the respiratory mechanism of *O. struma* and its evolutionary characteristics. These results demonstrated that smaller *O. struma* had higher underwater OCR than larger individuals. Epidermal respiration differed significantly at various temperatures, salinities, and pH values ($P < 0.05$). The OCR and the inner and outer diameter of the mucus gland increased as water temperature increased below 25°C. The highest values were observed at 25°C and then began to decrease gradually at temperature above 25°C. The thickness of the dermis decreased with increasing temperature. The number and the inner and outer diameter of the granular gland did not differ considerably between temperature groups. The differences with respect to salinity in dermis thickness and inner and outer diameter of the mucus gland/granular gland were the same as those with respect to temperature. The highest values were observed at salinity 25. The pH also had a significant effect on respiration. The OCR and inner and outer diameter of the mucus gland increased with pH, while dermis thickness and inner and outer diameter of the granular gland decreased. The number of granular glands first increased and then decreased; peak values were observed at a pH of 8.1. However, respiration levels decreased with time in all groups. In conclusion, environmental factors such as temperature, salinity, and pH had significant effects on underwater epidermal respiration. Items such as dermis thickness and the inner and outer diameter of the granular gland play more important roles in epidermal respiration in *O. struma* than the granular gland, which may be key to keeping the body wet and protecting it from invasion or damage from its habitats. *O. struma* showed optimum respiration metabolism in water at a temperature of 25°C, salinity 25, and pH 8.1. At lower temperature (15°C), higher salinity (45 psu), and lower pH (pH 7.5), this organism will be under considerable stress. This might be related with to the factors associated with its optimal living conditions. The results of this study will provide basic information for the protection and aquaculture of this species and will also be helpful to understand the evolution from aquatic to terrestrial life.

Key words: *Onchidium struma*; individual size; environmental factors; oxygen consumption rate; skin characteristics

Corresponding author: Huang Jintian. E-mail: hjt@ycit.cn