

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17252

基于心电图法(ECG)的牙鲆听觉特性研究

邢彬彬^{1,2}, 王振宇², 张国胜², 庄鑫², 殷雷明², 王羿宁², 李泓泉², 刘景²,
刘宏超², 许柳雄^{1,3,4}

1. 上海海洋大学 海洋科学学院, 上海 201306;
2. 大连海洋大学 海洋科技与环境学院, 辽宁 大连 116023;
3. 上海海洋大学, 教育部大洋渔业资源可持续利用重点实验室, 上海 201306;
4. 上海海洋大学, 农业部大洋渔业资源环境科学观测实验站, 上海 201306

摘要: 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)为底栖无鳔鱼类, 是中国北方重要的海水经济鱼种。本研究通过自主构建的鱼类听觉测量系统, 使用心电图法(electrocardiogram, ECG)分别以声刺激频率为 60 Hz、100 Hz、150 Hz、200 Hz、300 Hz、400 Hz、500 Hz、700 Hz 的正弦波纯音, 对 20 尾牙鲆的听觉阈值进行测定, 并绘制出牙鲆的听觉阈值曲线, 研究了牙鲆的听觉特性。结果表明, 20 尾牙鲆均记录到声刺激诱发心率信号, 牙鲆对 60~200 Hz 的低频音较敏感; 最敏感频率为 100 Hz, 其听觉阈值为(94±1.5) dB。本研究可以帮助了解牙鲆的听觉特性, 一方面可为鱼类听觉特性的基础研究提供参考, 另一方面为今后我国牙鲆的增殖养殖工作, 以及海洋牧场建设提供数据支撑。

关键词: 心电图; 牙鲆; 听觉阈值; 电刺激

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)03-0467-08

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)属鲽形目(Pleuronectiformes)、牙鲆科(Paralichthyidae), 为底栖无鳔鱼类^[1], 是中国北方海洋牧场中重要的经济鱼种。牙鲆幼体有鳔, 变态发育后无鳔^[2], 主要通过内耳和侧线来感受声音。

鱼类的听觉能力在其索饵、洄游、集群、生殖、防御, 以及声通讯交流等方面具有重要的作用^[3]。鱼类的听觉特性包括鱼类可听到的频率范围、鱼类的听觉阈值和鱼类听觉最敏感的频率。常用的鱼类听觉特性的测量方法包括行为学方法^[4]、内耳微音器电位法^[5]、听性诱发电位法^[6]、呼吸法^[7]、听觉脑干(auditory brainstem response, ABR)法^[8]以及心电图法^[9](electrocardiogram, ECG)。藤枝繁等^[7]对罗非鱼(*Tilapia niloticus*)用呼吸法和 ECG 法两种方法测量的听觉阈值进行比较, 两种方法

测量结果基本一致, 但呼吸法受到麻药剂量的影响; 2005 年, Kojima 等^[10]的研究结果表明, ECG 法和 ABR 法均可对鲤科鱼类听觉阈值进行测量, 并对结果进行比较, 发现两种实验方法测得同种鱼的听力敏感曲线结果基本一致, 但 ABR 法易受限于仪器设备的影响。

ECG 法是一种行为学和电生理学相结合的实验方法。1976 年, Sawa^[11]首次用 ECG 法研究金鱼(*Carassius auratus*)的听觉特性, 研究结果表明, 金鱼感受到声音刺激后心率变缓。Ishioka 等^[12]在使用 ECG 法研究真鲷(*Pagrus major*)的听觉特性时, 发现环境噪声会对真鲷的听觉阈值产生遮蔽效果。1995 年, 藤枝繁等^[7]首次用呼吸法对牙鲆听觉特性进行研究, 结果发现牙鲆对 70~100 Hz 的声音较敏感。张国胜^[9]在用 ECG 法对黄盖鲽

收稿日期: 2017-07-06; 修订日期: 2017-09-25.

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2013BAD23B02); 农业部北方海水增殖重点实验室开放课题(2014-MSENC-KF-13).

作者简介: 邢彬彬(1982-), 男, 副教授, 主要从事鱼类行为学研究. E-mail: xingbinbin@dlou.edu.cn

通信作者: 许柳雄, 教授, 主要从事渔具渔法、渔具力学研究. E-mail: lxxu@shou.edu.cn

(*Limanada limanada*)进行的听觉特性研究中指出,黄盖鲮对不同频率声音的敏感度不同。Campbell等^[13]发现,ECG和声音频谱分析相结合可研究鱼类的心率和呼吸频率变化,当鱼类受到声音刺激后,心跳和呼吸频率会减缓,可以通过声音频谱来判断产生刺激声音的频率,因此认为二者相结合的实验方法所得的结果相对准确。

目前,使用 ECG 法对鱼类听觉特性的研究,我国还处于空白阶段。本研究通过自主建立的鱼类听觉阈值测量装置,使用 ECG 法测量了牙鲆的听觉阈值,并绘制出牙鲆听力图,分析了牙鲆的听觉特性,旨在为今后我国海洋牧场建设中牙鲆的增殖养殖工作,以及使用 ECG 法对鱼类听觉进行基础研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验鱼

本次实验用的牙鲆成鱼购于当地牙鲆养殖场,其体重 0.6~0.9 kg、体长 26.3~29.2 cm,于室内水槽(4.25 m×2 m×1 m)中暂养 3 d,鱼类听觉实验所有的水槽为玻璃水槽(0.6 m×0.4 m×0.4 m),水温 18~22℃,盐度 30。

1.2 实验方法

1.2.1 建立条件反射 实验开始前,先将试验鱼安置于实验水槽中,稳定 20 min 后再开始实验。实验开始时,使用声电刺激相结合,分别以频率为 60 Hz、100 Hz、150 Hz、200 Hz、300 Hz、400 Hz、500 Hz、700 Hz 的纯音作为声刺激源,并参考张国胜^[9]的方法,在 60~300 Hz 播放的纯音声压级约为 125 dB (re: 1 μPa),在 400 Hz 播放的纯音声压级约为 140 dB。在选取试验鱼时,试验鱼会出现惊吓逃避行为,此时,随着试验鱼体游泳速度的增加,心率也随之加快。电刺激方法为:首先将试验鱼安置于两块规格相同的铁质电极板(30 cm×50 cm)中间,而后电极板连接于直流稳压器(QJ3005S II, QJE, 中国),并以 12 V 作为电刺激源,在纯音发声 1 s 后,间隔 0.1 s 对试验鱼进行一次电击。每组实验间隔 5 min,重复 7 次,同时监测试验鱼的心电率变化,当试验鱼感觉到声音刺激时,其心搏速率将自动放缓,以此预防随之而来的电击,

此时,认为声电刺激驯化完成,条件反射已建立。

1.2.2 实验装置 实验装置如图 1 所示,包括:(1)隔音室(NPR-6, 诺声, 中国)。隔音室内背景噪声为 30 dB (re: 1 μPa)。(2)电刺激系统。直流电源(QJ3005S II, QJE, 中国)连接两块规格相同的铁板作为电极板。(3)声刺激系统。使用两个同种型号的扬声器(YD380, 飞乐, 中国)作为刺激声源,由信号发生器(AFG-3022B, Tekronix, 美国)连接放大器(PRO-SO, Xlcuphase, 中国)输出声信号。水槽放在两个扬声器中间,扬声器距离水槽外壁 5 cm,使两个声信号同振幅、同相位,建立类匀强声场。同时,使用水下声音测量系统(Aqua-feeler IV, Roland, 日本)对声音环境进行监测。(4)数据记录系统。将心电图和信号发生器的信号导入示波器(DPO3041, Tekronix, 美国)进行记录。

实验水槽下方铺垫海绵减少震动。用纱布包裹试验鱼体躯干部并保持鳃盖和尾部露出,然后固定于水槽中心,并保持试验鱼头部方向与声场中心的位置重合。实验水槽上方,采用富氧海水过滤和循环装置,为水槽内提供海水循环。此外,在听觉测量时,为了避免海水循环装置的工作噪声对实验结果的影响,实验时需将过滤器关闭。

1.2.3 声音解析 实验过程中的水下声音监测,是由日本 AQH 公司开发的水下声学测量系统完成的。其中包括水听器(AQH20k-1062, Aquasound, 日本)、声学数据分析软件(AQLevelMeter1607)、录音机,以 16 bits/s、96 kHz 采样率进行录制并存储为 WAV 格式。根据鱼类的听觉特性^[11]对声音数据进行 1/3 倍频程分析^[14]。

在 ECG 实验之前,先要对刺激声音进行校正,频率依次为 60 Hz、100 Hz、150 Hz、200 Hz、300 Hz、400 Hz、500 Hz、700 Hz 的正弦波连续信号。图 2 为以刺激音频为 100 Hz 的背景噪声图谱。

1.2.4 心电图记录 在 ECG 实验前,首先对试验鱼进行麻醉。从暂养水槽中,随机挑选一尾健康的试验鱼,放入鱼安定(MS-222, 间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐)有效浓度为 0.2 g/L 的水体中,经过 60~90 s 后鱼体失去平衡,在 200~260 s 后鳃盖仅有轻微振动时,麻醉完成。试验鱼的心电图采用外直径 0.5 mm 的绝缘银线作为导出电极,

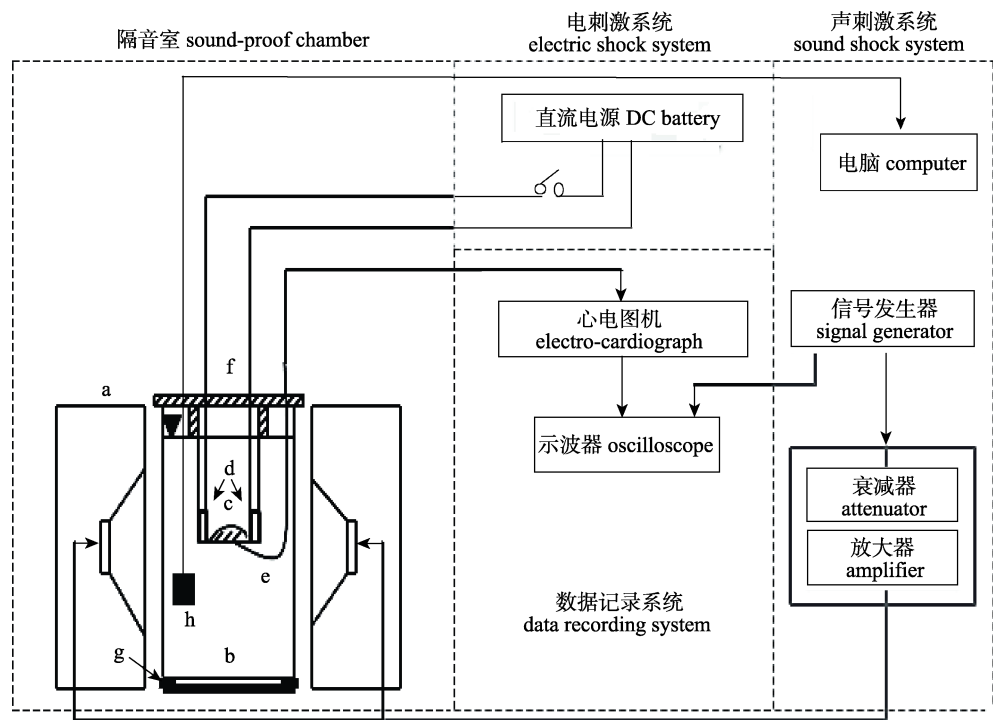


图 1 实验装置图

a. 扬声器; b. 实验水槽; c. 试验鱼; d. 刺激电极; e. ECG 电极; f. 固定框架; g. 海绵垫; h. 噪声解析系统.

Fig.1 The schematic diagram of experimental device

a. Speaker; b. Water tank; c. Fish; d. Stimulating electrode; e. ECG electrode; f. Fixed frame; g. Rubber mat; h. Hydrophone directivity.

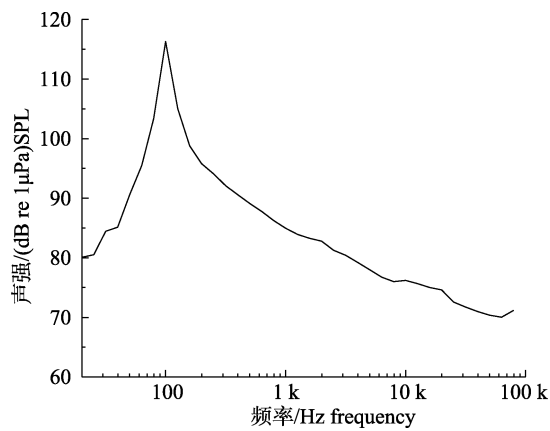


图 2 100 Hz 噪声图谱

Fig.2 Noise spectra under 100 Hz

银线露出部分长度为 0.3~0.5 mm。将电极紧贴试验鱼胸腔外膜插入,并使银线露出部分置于试验鱼胸腔位置,然后将电极在鱼体露出两侧部位固定,防止电极窜动,而后连接于心电图机(ECG-101G, 邦健, 中国)对试验鱼的心电图信号进行采集,最终传导到示波器上实时监测并离线存储。

在条件反射建立完成后 1~2 h 进行听觉阈值

的测量。通过观察试验鱼的心电图周期变化是否规律,来判断试验鱼是否适合实验。声刺激的声压,通过放大器和信号发生器相结合,以 1~2 dB 幅度进行微调节。心电图与刺激声音信号同时记录,每次实验记录 1 min,同时观察试验鱼对声音刺激有无反应。每组声刺激实验,如果试验鱼 2 次或 2 次以上出现相同的心率延长周期,则认为此时的声压级为该频率上试验鱼的听觉阈值^[9]。最后,使用 SPSS 20 对数据进行统计处理。实验数据用平均值±标准误($\bar{x} \pm SE$)表示。

2 结果与分析

2.1 牙鲆 ECG 信号

2.1.1 实验前 试验鱼的心电图信号首先由记录电极采集传输到心电图机,再导入示波器存储。试验鱼的心电图如图 3 所示,两个波谷之间为 1 个心率周期,为(0.89±0.1) s。图中 16 s 内出现了 18 个心率周期,由此推断试验鱼心跳约为 67 bpm (beat per minute)。通过观察随机挑选鱼的心电图,判断心率周期是否稳定,进而判断其可否用作试验鱼。

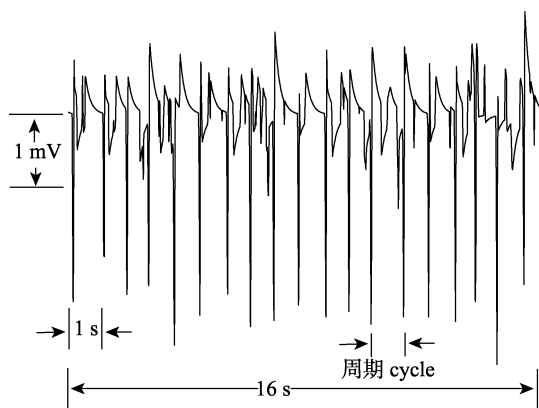


图 3 牙鲈心电图信号

Fig.3 Electrocardiogram waveforms of *Paralichthys olivaceus*

2.1.2 声电刺激 如图 4 所示, 试验鱼在电刺激的过程中会出现心跳骤停现象。经过 7~9 s 短暂的恢复后, 试验鱼心跳开始恢复。其恢复的周期随着电击次数的增加而减少, 如图 5 所示。在试验鱼心跳恢复初期, 心跳处于不平稳状态, 心跳的间隔和振幅都与正常状态有差异, 经过 5~7 min 恢复后, 试验鱼心跳重新恢复正常。

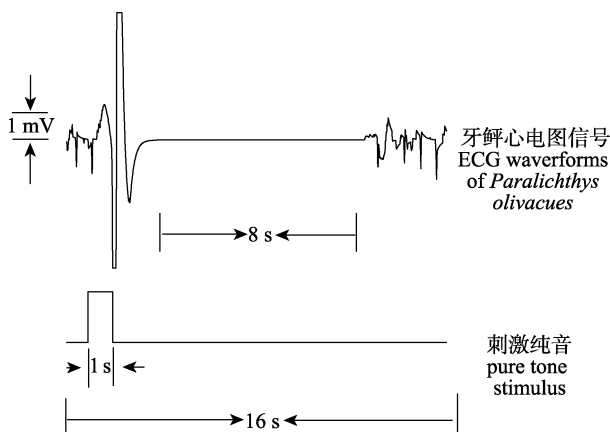


图 4 电刺激时牙鲈心电图信号

Fig.4 ECG waveforms of *Paralichthys olivaceus* in response to electrical stimulation

2.1.3 声刺激(无电) 试验鱼在建立条件反射后, 对声音刺激产生了记忆, 在感受到声音刺激后产生心率周期的变化。试验鱼在受到刺激时心跳减慢, 波形中两波峰间的间距明显变大, 心率周期延长。声刺激(无电)时播放纯音信号为 1~2 s, 波形变化明显, 可以清晰地看出心率周期从反应前的(0.89±0.1) s, 延长至(2.02±0.6) s, 如图 6、图 7 所示。

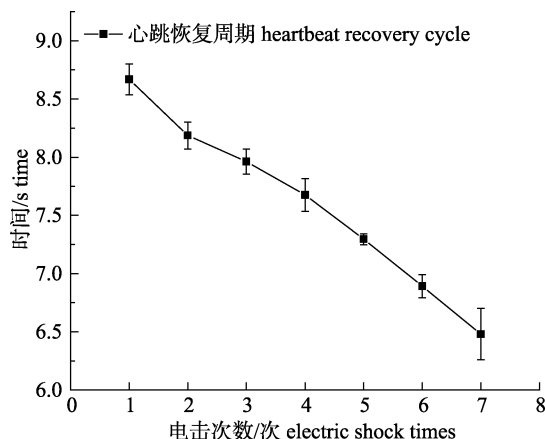


图 5 试验鱼电击次数与心跳恢复周期

Fig.5 Test fish electric shock times and heartbeat recovery cycle

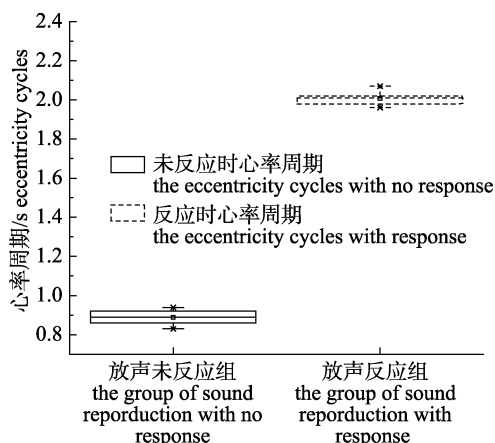


图 6 试验鱼未反应时的心率周期与反应时的心率周期

Fig.6 Test fish's eccentricity cycles with no response and the eccentricity cycles with response

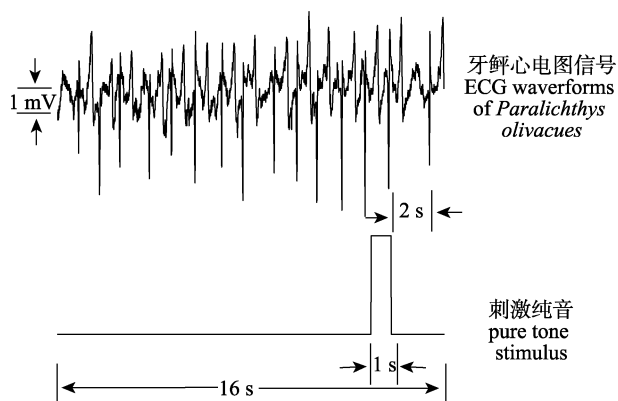


图 7 反应时牙鲈心电图信号

Fig.7 ECG waveforms of *Paralichthys olivaceus* during reaction process

2.2 牙鲈听力图

在 60~700 Hz, 20 尾试验鱼均记录到诱发心

率变化最小的纯音信号值。求出每一个频率的平均阈值, 绘制出牙鲆听力图, 如图8所示。根据本实验所测得的牙鲆在 60~700 Hz 的听觉阈值, 绘制的试验鱼听觉敏感曲线呈现出类似“V”字形的走势, 即在 60~200 Hz 带宽中阈值较低, 在 100 Hz 时听觉阈值最低, 在 300 Hz 以上带宽中听觉阈值则较高。其中 60~200 Hz 为敏感频率, 听觉阈值均在 136 dB 以下。牙鲆的最小听觉频率为 100 Hz, 最低听觉阈值为 (94 ± 1.5) dB。

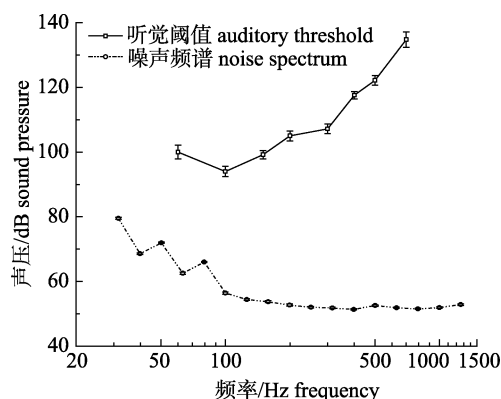


图8 牙鲆的听力图与背景噪声频谱特征

Fig.8 Audiogram of *Paralichthys olivaceus* and spectrum character of background noise

3 讨论

3.1 ECG 采集方法比较

ECG 法的记录电极数量和插入位置的选择, 应当与试验鱼鱼体大小和体型吻合。对于体型偏小的虾虎鱼(*Bathygobius fuscus*), 张国胜^[15]的研究表明, 采用双电极接近围心腔引导虾虎鱼的心电图是一种较好的方法; 而对于体型呈纺锤形的鱼类, 如藤枝繁等^[7]对罗非鱼的 ECG 研究表明, 采用两根电极针, 同时贴近插入罗非鱼心脏壁, 可采集到其心电图信号; 对于体型同呈纺锤形的竹荚鱼, Cheng 等^[16]研究表明, 使用双电极法, 可实时监测并导出竹荚鱼的 ECG 信号, 观察其疲劳状态与心率变化的关系; 张国胜^[9]的研究表明, 对于同属鲆鲽类、体型呈扁平状的黄盖鲽, 采用单电极法可导出其 ECG 信号。

本研究对试验鱼使用单电极法, 其中 20 尾试验鱼均采集到清晰稳定的 ECG 信号。与双电极法相比, 其优点是操作简单, 对鱼体本身伤害较小,

采集电极易固定, 导出信号稳定, 适用于体型扁平的鱼。

3.2 牙鲆的听觉特性

鱼类的内耳通常能感觉 16~1300 Hz 的声波振动, 而侧线则对低频振动较敏感, 尤其对频率 50~100 Hz 的声波振动最敏感。藤枝繁等^[7]采用呼吸法对牙鲆听觉阈值测量的研究表明, 牙鲆对 70~100 Hz 的声音较敏感, 最敏感的频率为 100 Hz, 最低听觉阈值为 92 dB, 对 200 Hz 以上频率的声音敏感度较弱。本研究结果与藤枝繁等^[7]的测量结果相似, 牙鲆对 60~200 Hz 的低频音较敏感; 最敏感频率为 100 Hz, 最小听觉阈值为 (94 ± 1.5) dB。与 ECG 法相比, 呼吸法在数据处理中, 是对采集到的所有产生反应的听觉阈值进行平均值计算, 最终得到鱼类的听觉阈值的平均数; 而 ECG 法通过刺激声音从高到低的播放, 观察试验鱼是否反应, 得到试验鱼产生反应时刺激声音的临界值, 从而可以准确测得最小听觉阈值。同时, 研究结果也与黄盖鲽听觉阈值曲线相似^[9], 但黄盖鲽听觉能力在 60~700 Hz 频率范围内要比牙鲆敏感(图 9)。

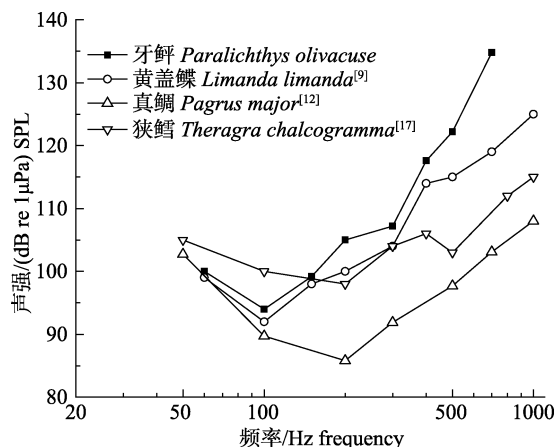


图9 4种鱼听觉阈值曲线^[9, 12, 17]

Fig.9 Comparisons of hearing threshold of four kinds of fish^[9, 12, 17]

与其他有鳔鱼类相比, Ishioka 等^[12]采用 ECG 法对真鲷的研究结果表明, 其最敏感听觉阈值在 200 Hz 时约为 85.8 dB, 听觉敏感频率在 100~300 Hz (图 9)。真鲷和牙鲆同属底栖鱼类, 对 60~100 Hz 声音的敏感度相似; 但在 100 Hz 以上

频率,真鲷对声音的敏感度比牙鲆强,这是由于鳔对鱼类的听觉起辅助作用,增强了鱼对声音的敏感性。朴容石等^[17]对中下层有鳔鱼类狭鳕(*Theragra chalcogramma*)的研究结果表明,采用 ECG 法测得其听觉敏感频率在 50~300 Hz,其中 200 Hz 时的听觉阈值最小,为 98 dB。牙鲆与狭鳕相比,对 150 Hz 以下的声音更加敏感,表明底层鱼类对频率相对较低的声音更加敏感。而狭鳕对 150 Hz 以上频率的声音更加敏感,鳔对狭鳕的听觉起到了辅助作用。

3.3 环境噪声的影响

高强度噪声对鱼类的影响主要体现在暂时性听觉阈值位移及应激水平的提高^[18],也会引起血液循环系统和神经组织损伤等^[19-20],同时还会造成鱼类行为的改变,如趋避噪声源,逃离摄食、产卵场所等^[21]。

当前,除人工养殖的牙鲆外,野生牙鲆资源已经极为匮乏。牙鲆为海洋牧场中重要的经济鱼种之一,应选取适当的区域建设海洋牧场,通过海上音响驯化及增殖放流恢复牙鲆资源。

室内养殖环境噪声主要来源于养殖设备产生的低频噪声。殷雷明等^[22]的研究结果表明,开放式玻璃钢水槽内,其环境噪声源包括主频率峰值为 100 Hz 的养殖工作设备与水槽内壁的低频共振噪声;并指出,长期暴露在 100~1000 Hz 低频强噪声下,鱼类的生理健康会受到影响。Craven 等^[23]的研究结果表明,在循环水养殖环境中,环境噪声在低频区达到最高,在 102 Hz 时达到 124 dB。汤涛林等^[24]的研究结果表明,罗非鱼声控投饵采用的循环水槽,循环噪音呈周期性。由于我国交流电频率为 50 Hz,而且现场设备噪声中 50 Hz 工频及其谐波是最强的干扰源,这与本研究中 50 Hz 时环境噪声最高一致。汤涛林等^[25]指出,噪声过高会影响试验鱼食欲。海上环境噪声通常包括船舶噪声、工业噪声等人为水下噪声。Braun^[25]的研究结果表明,人为水下噪声对鱼类的内耳、侧线等感官会造成损伤;短时间处于水下噪声环境中,会造成听觉阈值短暂性位移;长时间处于水下噪声环境中,会造成细胞组织损伤,听觉阈值产生永久性位移。Williams 等^[26]对船舶

发出的水下噪声的研究表明,船舶发出的水下噪声会增加海洋生物死亡率。

本研究结果表明,牙鲆对 60~200 Hz 的低频音敏感。因此,今后在牙鲆室内养殖和海水增殖放流时,应当重视养殖设备噪声对牙鲆健康的影响,同时在选择放养海区时,也要考虑海上环境噪声是否适宜牙鲆的增殖放流以及音响驯化。

综上所述,牙鲆为北方主要经济鱼类之一,本研究通过自主建立的鱼类听觉阈值测量装置,使用 ECG 法测量了牙鲆的听觉阈值,可为提高牙鲆的人工饲养效率提供参考依据,为选择适宜的养殖环境、改良设备、减少环境噪声对牙鲆养殖的影响提供参考。同时,开展鱼类听觉的基础研究,全面了解某些经济鱼类的听觉能力,一方面可为研制开发高效节能、资源养护型渔具以及发展增殖渔业提供参考^[27],另一方面可为今后鱼类听觉特性在捕捞领域的应用提供详实的资料,具有十分重要的意义。

参考文献:

- [1] Shi Q, Fan M J, Zhang Y. Economically Important Fish in China[M]. Wuhan: Huazhong University of Science & Technology Press, 2015. [石琼, 范明君, 张勇. 中国经济鱼类志[M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 2015.]
- [2] Tian Y S, Chen S L, Yan A S, et al. Study on the embryonic development of *Paralichthys olivaceus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2004, 28(6): 609-615. [田永胜, 陈松林, 严安生, 等. 牙鲆的胚胎发育[J]. 水产学报, 2004, 28(6): 609-615.]
- [3] He D R, Cai H C. Fish Behavioral Science[M]. Xiamen: Xiamen University Press, 1998. [何大仁, 蔡厚才. 鱼类行为学[M]. 厦门: 厦门大学出版社, 1998.]
- [4] Yan H Y, Popper A N. Auditory sensitivity of the cichlid fish *Astronotus ocellatus* (Cuvier)[J]. Journal of Comparative Physiology A, 1992, 171(1): 105-109.
- [5] Huang Y L. Studies on the charaters of response of four species of Ostraiophysines to acoustic intermittency[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 1984, 23(1): 103-110. [黄玉霖. 四种骨鳔类对间歇声反应特性的研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1984, 23(1): 103-110.]
- [6] Radford C A, Montgomery J C, Caiger P, et al. Pressure and particle motion detection thresholds in fish: A re-examination of salient auditory cues in teleosts[J]. Journal of Experimental Biology, 2012, 215: 3429-3435.

- [7] Fujieda S, Mori T, Yamanaka Y, et al. Measurement of auditory threshold in fishes by piezoelectric sensor[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1996, 62(1): 40-45. [藤枝繁, 森隆, 山中有一, et al. 圧電センサを利用した魚類の聴覚閾値測定[J]. 日本水産学会誌, 1996, 62(1): 40-45.]
- [8] Liu M, Wei Q W, Du H, et al. Auditory thresholds of Chinese sucker *Myxocyprinus asiaticus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(4): 750-757. [刘猛, 危起伟, 杜浩, 等. 胭脂鱼听觉阈值研究[J]. 中国水产科学, 2013, 20(4): 750-757.]
- [9] Zhang G S. The study of hearing capacity of *Limanada limanada*[D]. Hokkaido: Hokkaido University, 1999: 14-38. [張国勝. マコガレイの聴覚特性に関する研究[D]. 北海道: 北海道大学, 1999: 14-38.]
- [10] Kojima T, Ito H, Komada T, et al. Measurements of auditory sensitivity in common carp *Cyprinus carpio* by the auditory brainstem response technique and cardiac conditioning method[J]. Fisheries Science, 2005, 71(1): 95-100.
- [11] Sawa M. The audiogram of the goldfish determined by a heart rate condition method[J]. Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University, 1976, 27(3-4): 129-136.
- [12] Ishioka H, Hatakeyama Y, Sakaguchi S. The hearing ability of the red sea bream *Pagrus major*[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1988, 54(6): 947-951.
- [13] Campbell H A, Klepacki J Z, Egginton S. A new method in applying power spectral statistics to examine cardio-respiratory interactions in fish[J]. Journal of Theoretical Biology, 2006, 241(2): 410-419.
- [14] Yin L M, Huang H L, Zhang X G, et al. Underwater sound and behavior response of *Larimichthys crocea* in cage-culture[J]. Marine Fisheries, 2017, 39(1): 92-99. [殷雷明, 黄洪亮, 张旭光, 等. 网箱养殖大黄鱼水下声音与行为反应[J]. 海洋渔业, 2017, 39(1): 92-99.]
- [15] Zhang G S. Electrocardiogram of brown goby, *Bathygobius fuscus*[J]. Journal of Dalian Fisheries College, 1993, 8(2-3): 66-70. [张国胜. 深鰕虎鱼心电图的研究[J]. 大连水产学院学报, 1993, 8(2-3): 66-70.]
- [16] Cheng R B, Riyanto M, Arimoto T, et al. Fatigue analysis of the jack mackerel *Trachurus japonicus* by electrocardiographic monitoring during prolonged swimming[J]. Fisheries Science, 2017, 83(1): 73-82.
- [17] Park Y S, Iika K, Mukai T, et al. Auditory characteristics of walleye pollock *Theragra chalcogramma* (Pallas)[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1995, 61(2): 159-163. [朴容石, 飯田浩二, 向井徹, et al. スクトウダラの聴覚特性[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1995, 61(2): 159-163.]
- [18] Hattingh J, Petty D. Comparative physiological responses to stressors in animals[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Comparative Physiology, 1992, 101(1): 113-116.
- [19] Cernak I, Savic J, Malicevic Z, et al. Involvement of the central nervous system in the general response to pulmonary blast injury[J]. The Journal of Trauma, 1996, 40(3 Suppl): S100-S104.
- [20] Dodd K T, Mundie T G, Lagutchik M S, et al. Cardiopulmonary effects of high-impulse noise exposure[J]. The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care, 1997, 43(4): 656-666.
- [21] Engås A, Løkkeborg S. Effects of seismic shooting and vessel-generated noise on fish behaviour and catch rates[J]. Bioacoustics, 2002, 12(2-3): 313-316.
- [22] Yin L M, Chen X Z, Zhang X G, et al. Measurement and analysis of the aquaculture noise for *Larimichthys crocea* in the fiberglass fish tank[J]. Marine Fisheries, 2017, 39(3): 314-321. [殷雷明, 陈雪忠, 张旭光, 等. 玻璃钢水槽内大黄鱼养殖环境噪声测量与分析[J]. 海洋渔业, 2017, 39(3): 314-321.]
- [23] Craven A, Carton A G, McPherson C R, et al. Determining and quantifying components of an aquaculture soundscape[J]. Aquacultural Engineering, 2009, 41(3): 158-165.
- [24] Tang T L, Tang R, Liu S J, et al. Acoustic control of feeding in tilapia culture[J]. Progress in Fishery Sciences, 2014, 35(3): 40-43. [汤涛林, 唐荣, 刘世晶, 等. 罗非鱼声控投饵方法[J]. 渔业科学进展, 2014, 35(3): 40-43.]
- [25] Braun C B. Signals and noise in the octavolateralis systems: What is the impact of human activities on fish sensory function?[J]. Integrative Zoology, 2015, 10(1): 4-14.
- [26] Williams R, Wright A J, Ashe E, et al. Impacts of anthropogenic noise on marine life: Publication patterns, new discoveries, and future directions in research and management[J]. Ocean & Coastal Management, 2015, 115: 17-24.
- [27] Zhang G S, Zhang P D, Chen Y, et al. Acoustic behaviors control of juvenile *Carassius auratus* Linnaeus[J]. Journal of Dalian Fisheries College, 2002, 17(1): 48-52. [张国胜, 张沛东, 陈勇, 等. 鲫幼鱼音响驯化的研究[J]. 大连水产学院学报, 2002, 17(1): 48-52.]

Study on hearing capacities of *Paralichthys olivaceus* using an ECG method

XING Binbin^{1,2}, WANG Zhenyu², ZHANG Guosheng², ZHUANG Xin², YIN Leiming², WANG Yining², LI Hongquan², LIU Jing², LIU Hongchao², XU Liuxiong^{1,3,4}

1. College of Marine Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. School of Marine Science and Environment Engineering, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;
3. The Key Laboratory of Sustainable Exploitation of Oceanic Fisheries Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306, China;
4. Scientific Observing and Experimental Station of Oceanic Fishery Resources, Ministry of Agriculture; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: In recent years, as fishery resources have dwindled, the hearing capacities of fish have been studied in ambient noise assessments, for the protection of fish, and also in the construction of marine ranching by using the acoustic domestication method. The use of an electrocardiogram (ECG) offers a method for the study of fish hearing capacities. The method comprises behavioral and electrophysiology sciences and is based on a conditioned reflex reaction to acoustic and electrical stimulus to monitor the hearing threshold through the heart rate of fish. *Paralichthys olivaceus*, a bottom-living fish without a swim bladder, is predominantly a commercial species in northern China. The auditory sensor organs of *P. olivaceus* are the otolith and the lateral line. The objective of this study was to use an ECG method to measure the hearing threshold of *P. olivaceus*, by using self-established fish auditory sensation measuring devices, to provide a reference for the development and construction of marine ranching in China. The following acoustic stimulus frequencies were selected in the study: 60 Hz, 100 Hz, 150 Hz, 200 Hz, 300 Hz, 400 Hz, 500 Hz, 700 Hz and used to measure the hearing threshold of 20 independent fish, from which audiograms could be drawn and analyzed. Before the experiment, an acoustic and electrical stimulus conditioned reflex in the fish was established to ensure the fish could develop memories of the stimulus, and then the hearing threshold was estimated by monitoring the heart rate of the fish, which was recorded by using a silver wire inserted in the fish heart. The ECG signals from 20 ind fish were obtained and the results were as follows: the hearing sensitive frequency bandwidth of *P. olivaceus* was between 60 Hz and 200 Hz and the hearing threshold was below 136 dB (re: 1 μ Pa); 100 Hz was the most sensitive frequency bandwidth and the hearing threshold was 94 ± 1.5 dB. The advantages of ECG method were that a stable signal was obtained, the subjected fish show an obvious conditioned response to the acoustic stimulus, the quick recovery allowed repeated testing. The hearing threshold of *P. olivaceus* is similar to *Limanda limanda*, which have same body shape; they are sensitive to acoustic stimuli with a frequency of 60–200 Hz. The results of the study could help to promote fundamental research in fish auditory sensation and provide a reference for the construction of marine ranching and the future development of new tapes for fishing nets by using acoustic methods.

Key words: electrocardiogram; *Paralichthys olivaceus*; hearing threshold; electrical stimulus

Corresponding author: XU Liuxiong. E-mail: lxxu@shou.edu.cn