

Effects of Handling Stress Out of Water on Blood Parameters and Tank Water Cortisol in Brown Trout *Salmo trutta*

Xuemei Li, Deguo Yang*

Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation, Ministry of Agriculture of China Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan Hubei
Email: *yangdg@yfi.ac.cn

Received: Sep. 7th, 2018; accepted: Sep. 19th, 2018; published: Sep. 26th, 2018

Abstract

Brown trout was carried out of water for 30 s in the indoor aquaculture system, and the blood glucose concentration, blood cell volume, plasma cortisol content and intestinal permeability were measured after 1 h. Meanwhile, the content of cortisol in the tank water was measured to discuss the possibility of water cortisol as the non-invasive stress index of brown trout. The results showed that there were no significant differences in blood glucose concentration and blood cell between the stressed and control group, while the content of plasma cortisol increased significantly (74.83 ± 23.1 ng/mL vs. 142.93 ± 48.2 ng/mL, $P < 0.05$) in stressed fish. The intestinal wall potential difference (PD) was significantly lower, indicating that the stress could reduce the active transport between intestinal mucosa side and serous side. In addition, it was found that the tank water cortisol was rising and come to 0.009 ng/ (g * h) after 1 h. The study suggested that it is possible to consider tank water cortisol as the non-invasive stress index of brown trout in aquaculture system, which laid a theoretical foundation for improving fish welfare.

Keywords

Brown Trout, Cortisol, Non-Invasive Stress Index, Intestinal Wall Potential Difference

操作胁迫对褐鳟血液理化及养殖水体中皮质醇的影响

李学梅, 杨德国*

中国水产科学研究院长江水产研究所, 农业部淡水生物多样性保护重点实验室, 湖北 武汉
Email: *yangdg@yfi.ac.cn

*通讯作者。

摘要

在室内养殖系统中,对褐鲟进行离水操作30 s, 1 h后测定褐鲟血糖浓度、血细胞容积、血浆皮质醇含量、肠壁通透性等,同时分时间段来测定养殖水体中皮质醇含量,探讨其作为褐鲟无创性应激指标的可能性。结果显示:褐鲟离水操作1 h后,其血糖浓度和血细胞容积与对照组相比无显著性变化,但血液皮质醇含量显著升高(74.83 ± 23.1 ng/mL vs. 142.93 ± 48.2 ng/mL, $P < 0.05$)。操作胁迫后褐鲟肠壁电位差(Potential Difference, PD)发生明显的变化,应激组鱼肠壁PD值显著低于对照鱼,说明鱼类应激反应使肠道黏膜侧和浆膜侧的主动转运减少。另外,通过测定发现养殖水体中皮质醇在褐鲟操作胁迫后持续上升,1 h达到最高,含量为 0.009 ng/(g * h),再次验证了养殖水体皮质醇作为褐鲟无创性应激指标的可能性,为提高养殖鱼类福利奠定了理论基础。

关键词

褐鲟, 皮质醇, 无创应激指标, 肠壁电位差

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

操作胁迫是鱼类在养殖及实验过程中常见的物理应激因子,主要包括对鱼类的操作、低氧、拥挤、运输、空气暴露和机械损伤等[1]。这些因子会引发鱼体一系列的应激反应,如生长缓慢、成熟期延迟、繁殖力降低、免疫力下降、疾病多发等问题[2] [3],降低鱼类福利。有研究表明,应激导致养殖鱼类一系列问题与血液皮质醇激素浓度的持续升高有关[4]。血液皮质醇激素在鱼类应激反应初级阶段分泌并进入血液而引起机体生理代谢机能的改变,是鱼类应激反应的主要特征之一,被认为是鱼类应激的一个灵敏信号[5]。鱼类发生应激反应之后,血液中皮质醇会从鱼体慢慢释放到养殖水体中,如果可以通过监测养殖水体中皮质醇来判断鱼类的应激程度,并采取相应的措施,就可以避免操作胁迫对鱼体的伤害,提高鱼类福利[6]。

褐鲟(*Salmo trutta*)隶属于鲑形目(*Salmoniformes*)鲑科(*Salmonidae*)鲑亚科(*Salmoninae*),原产于欧洲、非洲北部和西亚地区,冷水性鱼类,肉质细嫩营养丰富,具有较高的经济价值[7]。褐鲟作为世界范围内重要的水产养殖对象,是最早的鲑鳟鱼类养殖品种之一,目前已成为鲑科鱼类中重要的商业鱼类之一[8]。因此在养殖过程中,褐鲟难免会发生低氧、拥挤、运输等操作胁迫,引发应激反应。有关褐鲟应激方面的研究报道主要包括养殖密度对褐鲟生长的影响[9] [10],应激对褐鲟血液皮质醇的影响[11]等。本研究主要针对褐鲟的操作胁迫,通过测定应激与非应激鱼体的血细胞比例、血糖浓度和血液的皮质醇浓度以及肠壁的通透性来阐述鱼类应激反应过程的生理生化因素的变化情况,同时测定操作胁迫后养殖水体中皮质醇含量,旨在探索以褐鲟养殖水体中皮质醇含量为应激指标的无创方法。

2. 材料与方法

2.1. 褐鲟养殖

试验在挪威科技大学海洋实验室(NTNU, Sealab Fishing System)循环淡水养殖系统中进行。选用体质

健壮的1+龄褐鳟, 体重和全长分别为 (175.2 ± 21.06) g 和 (18.8 ± 1.28) cm。试验开始前共 50 条褐鳟(未分雌雄)在 1#养殖桶中进行养殖, 养殖桶大小为 90 cm × 80 cm × 60 cm, 水深 50 cm。试验用水 pH 7.5~8.0, 溶氧 8.9~11.2 mg/L, 水温 7.0°C~8.5°C。光照周期为 24 L:0D。

2.2. 褐鳟血液、肠道样本制备及测定

试验开始后, 将试验鱼禁食 12 h, 从 1#养殖桶快速捞起数条, 取 5 条鱼作为对照样本。1 周后, 将 1#养殖桶中的褐鳟鱼全部快速捞起, 离水 30 s 之后, 转移到 2#养殖桶中, 待鱼类反应 1 h 后, 取出 5 条鱼作为操作胁迫组样本, 剩余的鱼类留在 2#桶继续养殖。

快速抽取所有鱼类样本的血液, 通过血糖监测仪(Freestyle lite, Abbott, UN)和微型离心机(Compur, Germany)来分别测定血糖浓度和血细胞比例。剩余血液经 4°C, 3500 r/min 离心 5 min, 获取血浆, -80°C 保存备用。血浆皮质醇含量是通过血液皮质醇试剂盒(ABL, Germany)来测定。

解剖鱼体, 获得后肠, 尽量清除干净肠壁外的脂肪和微血管等组织。剪开肠道, 清洗内容物并置于 Ringer 缓冲液[12]以确保肠道组织的活性, 所有的操作均在冰上进行, 并尽快将肠壁固定到 Ussing Chamber 系统上来测定鱼类肠壁的通透性[12]。本研究以肠壁的转运电位差(Potential Difference, PD)的值来判断鱼类肠壁的通透性。某些电解质可通过主动或被动转运的方式穿过肠道上皮, 从而使肠道黏膜侧和浆膜侧产生电位差, 简称 PD, 调零后, 电解质的被动转运被抑制, 而主动转运仍在继续。因此, 此时肠道黏膜侧和浆膜侧的 PD 的改变即反映了主动转运的变化[13]。

2.3. 养殖水体样本制备及测定

完成上述操作胁迫试验 1 周后, 待 2#养殖桶中剩余 40 尾褐鳟恢复到非应激状态, 准备一个 3#养殖桶, 装满水, 并取 1 L 水样作为对照组 1。在对 2#养殖桶中的褐鳟进行应激操作之前, 关闭水循环系统, 取 1 L 水样作为对照组 2。将 2#养殖桶的褐鳟迅速捞起, 离水 30 s 后, 放到 3#养殖桶, 待 40 尾全部转移完成后计时, 每隔 10 min 取样 1 次, 每次 1 L 水样, 分别为 T10、T20、T30、T50、T60。

利用水泵和滤膜(Sep-Pak filter, Waters, USA), 以 25 ml/min 的速度过滤水样, 将水体中的皮质醇收集到滤膜上。通过乙酸乙酯溶解并洗脱滤膜上的皮质醇, 利用氮气吹干样品, 并通过水体皮质醇试剂盒(ParameterTM Cortisol Assay, R & D, USA)来测定皮质醇含量。

2.4. 数据分析

血浆和水样皮质醇均采用放射免疫方法, 通过紫外-可见分光光度计(Gary 50, Varian, USA)来分析读数。采用 IBM SPSS statistics 22 软件进行 Student's t-test 统计分析与显著性检验, $P < 0.05$ 为差异显著。

3. 结果与分析

3.1. 操作胁迫后褐鳟血液生理变化

将褐鳟进行离水空气暴露操作后, 鱼体显得烦躁不安、剧烈游动、有集群行为, 1 h 后, 鱼体变得安静, 待在养殖桶底部, 鲜少运动。

通过测定发现, 应激组鱼体血糖和血细胞容积分别为 3.28 ± 0.51 mmol/L 和 $41.67\% \pm 1.20\%$, 对照组鱼体血糖和血细胞容积分别为 2.63 ± 0.08 mmol/L 和 $39.0\% \pm 4.13\%$, 两个处理组的比值没有显著差异($P > 0.05$, 图 1)。对鱼体血液皮质醇进行测定, 结果显示相比较对照组鱼(74.83 ± 23.1 ng/mL), 1 h 后, 应激组鱼体血液皮质醇显著增加(142.93 ± 48.2 ng/mL, $P < 0.05$, 图 2)。

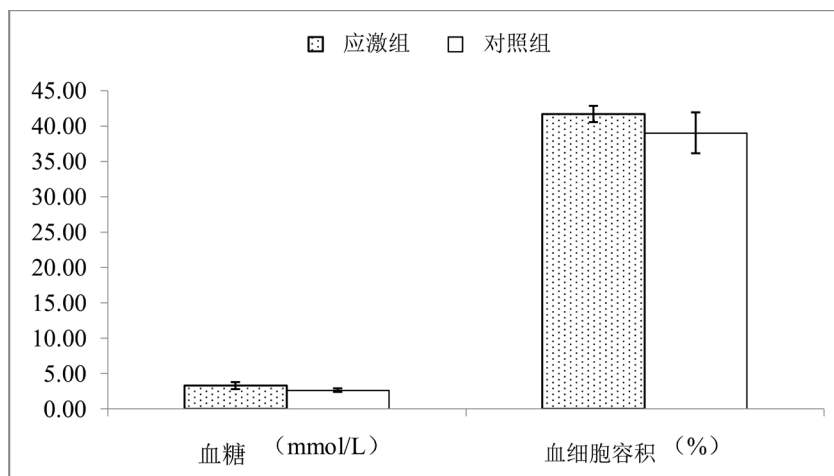


Figure 1. Blood glucose concentration and blood cell in the stressed and control fish
图 1. 应激与对照鱼血糖和血细胞容积的变化

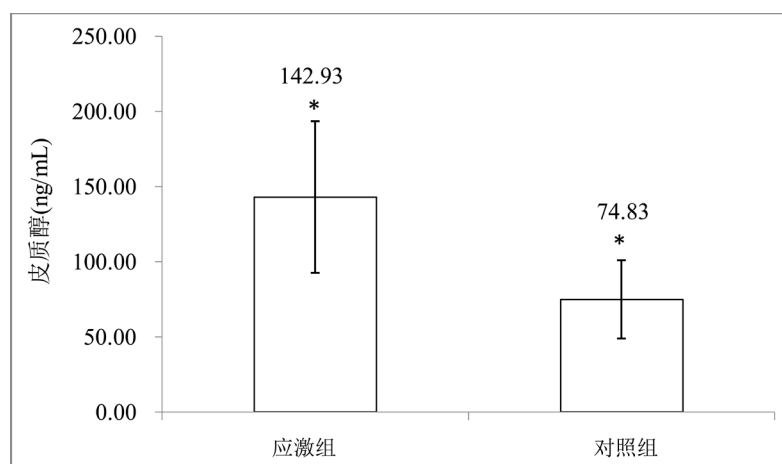


Figure 2. Content of plasma cortisol in the stressed and control fish
图 2. 应激与对照鱼血液皮质醇的变化

3.2. 操作胁迫后褐鲟肠壁生理变化

图 3 显示, 鱼体受到操作胁迫后肠壁电位差(PD)发生明显的变化, 对照组鱼肠壁 PD 值显著高于应激组鱼类, 说明鱼类受操作胁迫 1 h 后, 肠壁结构会发生变化, 电位差降低, 肠壁通透性发生变化, 肠道黏膜侧和浆膜侧的主动转运减少, 肠壁吸收功能受到影响[14]。

3.3. 操作胁迫后褐鲟养殖水体皮质醇含量

通过对水体中皮质醇的收集和测定, 结果显示, 2 个对照组中水体皮质醇含量较低, 操作胁迫发生后随着时间推移, 水体中皮质醇含量呈上升趋势, 1 h 后, 水体中皮质醇含量达到 27.27 ng/mL (图 4)。通过计算水体的流量和鱼类的总生物量, 水体中每小时每克褐鲟鱼应激后皮质醇含量为 0.009 ng/(g * h), 说明通过水体中皮质醇含量来推算鱼类应激情况是可行的。

4. 讨论

褐鲟是鲑科鱼类中重要的商业鱼类之一, 在挪威、智利等国养殖市场大, 产量高[15]。随着养殖产量

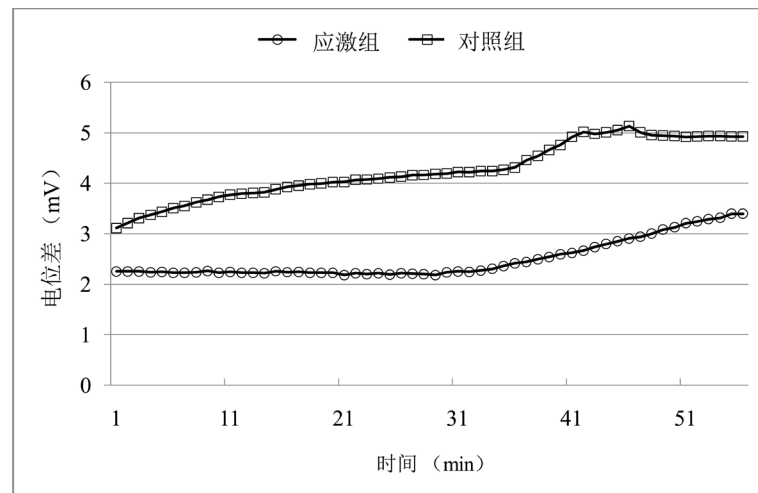


Figure 3. PD values of the stressed and control fish along time

图 3. 应激与对照鱼肠壁电位差(PD)值随时间的变化

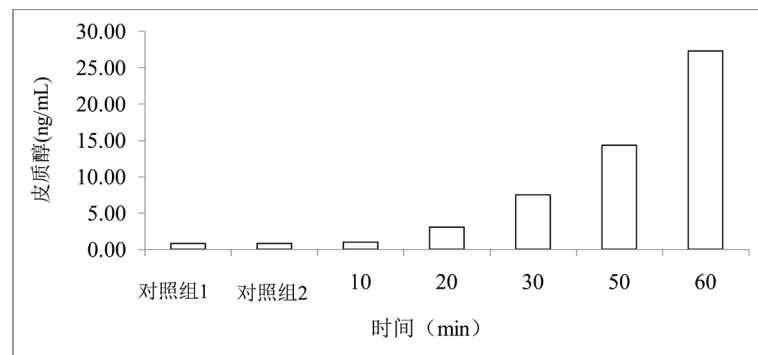


Figure 4. Content of water cortisol after stress

图 4. 鱼类受应激后水体中皮质醇含量的变化

的提高, 发达国家对褐鳟的品质及动物福利也越来越关注[16]。养殖鱼类受到的环境胁迫主要有: 化学胁迫、物理胁迫、生物胁迫、管理胁迫等[17]。其中操作胁迫是模仿挑鱼动作的一种胁迫, 属管理胁迫的一种, 在鱼类养殖过程中较常见。本研究主要针对褐鳟的急性操作胁迫, 探讨其血液生理指标及皮质醇在血浆和养殖水体中的变化。

鱼体血糖水平是机体内重要的供能物质, 是衡量机体营养状况的指标。常态下, 鱼体内的血糖浓度比较恒定, 随着机体的活动和环境的变化, 血糖浓度也会发生相应的变化。已有研究表明急性应激能够引起鱼类的高血糖症, 葡萄糖在胁迫后出现显著性升高并且一直维持在较高水平[18] [19]。本研究结果中血糖和血细胞容积在对照组和应激组鱼体内没有显著差异($P > 0.05$), 可能是由于本研究取样时间是操作胁迫 1 h 后, 此时血糖在机体内还没有发生显著的反应。有研究指出匙吻鲟受到捕捞胁迫 1 h 后, 血浆皮质醇和乳酸盐显著升高, 而血糖无显著变化[20]。孙学亮等[21]也指出捕捞胁迫后, 半滑舌鲷血液葡萄糖含量在胁迫后 12 h 才会升高, 并且一直维持在较高水平。

血液皮质醇被认为是评价鱼类初级应激反应的敏感指标, 在应激过程中具有糖异生和免疫抑制等作用[22]。国内外很多学者都将血液皮质醇水平做为一项对应激研究的重要指标, 用以反映应激状态下内分泌系统的变化[3] [17] [23] [24]。本研究中操作胁迫 1 h 后, 应激组褐鳟血液皮质醇浓度显著升高($P < 0.05$), 说明此时操作胁迫已引起褐鳟强烈的应激反应。赵建华[25]在研究圆口铜鱼空气暴露实验指出, 实验鱼血

浆皮质醇水平在刺激后的 1 小时达到最高值, 而在 4 小时恢复至应激前的水平。Fast *et al.* [26] 也指出大西洋鲑在操作应激 1 h 后, 皮质醇水平显著升高。

正常生理条件下, 鱼类肠粘膜具有屏障功能, 但粘膜两侧的离子是可以流通的, 这些离子流维持一定的浓度梯度, 从而形成一定的电位差, 即 PD。Gustke *et al.* [27] 指出肠道粘膜损伤可使 PD 值降低, PD 值可反映粘膜的完整性。本研究操作胁迫 1 h 后, 应激组鱼体肠壁 PD 值显著降低, 说明应激反应可破坏褐鳟肠粘膜屏障, 肠壁通透性发生变化, 进而增加了细菌、毒素等进入血循环的几率。相关研究已在小鼠中得到证实[13] [14]。因此, PD 作为肠道粘膜完整性指标, 可作为应激反应过程中的关键因子被应用到以后的研究中。

随着社会的发展, 鱼类福利问题日益重要, 出于对道德和产品质量方面的考虑, 消费者和生产者对养殖品种良好福利状况非常关注, 尤其是欧洲、美国等发达国家[6]。因此, 以水体中皮质醇含量为应激指标的无创方法已在虹鳟、鲤鱼、大西洋鲑等鱼类中进行应用[6] [28] [29]。本研究对室内养殖褐鳟操作胁迫后判断其应激反应的无创方法进行了初探, 结果显示水体中皮质醇在操作胁迫 1 h 后含量为 0.009 ng/(g * h)。此时褐鳟的行为表现为鱼体变得安静, 待在养殖桶底部, 鲜少运动, 1.5 h 后部分褐鳟开始在养殖桶内缓慢游动, 说明鱼体应激反应开始慢慢恢复。Lubke 和 Wedekind [6] 指出高密度养殖时, 虹鳟释放到水体的皮质醇量为 0.1 ng/(g * h), 胁迫方式的差异可能导致了鱼类应激反应的强烈程度。本研究再次证明了测定养殖水体皮质醇含量可作为一种提高鱼类福利无创性应激指标。

5. 结论

离水操作 30 s 可致使褐鳟产生应激反应, 1 h 后血液皮质醇显著升高, 但血糖浓度和血细胞容积没有显著变化。另外, 应激反应也可导致褐鳟肠道粘膜发生损伤, PD 值显著下降, 说明鱼类应激反应使肠道黏膜侧和浆膜侧的主动转运减少, 肠壁吸收功能受到影响。同时探讨了以养殖水体中皮质醇含量作为褐鳟无创性应激指标的可能性, 为提高养殖鱼类福利奠定了理论基础。

基金项目

中国水产科学研究院长江水产研究所基本科研业务经费(2017JBF0103)和现代农业产业技术体系专项资金(CARS-46)。

参考文献

- [1] Frick, L.H., Walker, T.I. and Reina, R.D. (2010) Trawl Capture of Port Jackson Sharks *Heterodontus portusjacksoni*, and Gummy Sharks, *Mustelus antarcticus*, in a Controlled Setting: Effects of Tow Duration, Air Exposure and Crowding. *Fisheries Research*, **106**, 344-350. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2010.08.016>
- [2] Walsh, P.J. (1997) Fish Stress and Health in Aquaculture. *Bulletin of Marine Science-Miami*, **61**, 501-502.
- [3] 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.
- [4] Barton, B.A. and Iwama, G.K. (1991) Physiological Changes in Fish from Stress in Aquaculture with Emphasis on the Response and Effects of Corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, **1**, 3-26. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(91\)90019-G](https://doi.org/10.1016/0959-8030(91)90019-G)
- [5] Barton, B.A. (2002) Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integrative & Comparative Biology*, **42**, 517-525. <https://doi.org/10.1093/icb/42.3.517>
- [6] Lubke, K. and Wedekind, H. (2016) Stress and Fish Welfare Non-Invasive Measurement of Cortisol in Fish Holding Water. *Journal of Aquaculture Research & Development*, **7**, 8 (Suppl).
- [7] Vøllestad, L.A., Olsen, E.M. and Forseth, T. (2002) Growth-Rate Variation in Brown Trout in Small Neighbouring Streams: Evidence for Density-Dependence? *Journal of Fish Biology*, **61**, 1513-1527. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2002.tb02494.x>
- [8] 王芳. 亚东鲑若干养殖生物学特性研究[D]: [硕士学位论文]. 上海: 上海海洋大学, 2015.

- [9] Jenkins Jr., T.M., Diehl, S., Kratz, K.W., *et al.* (1999) Effects of Population Density on Individual Growth of Brown Trout in Streams. *Ecology*, **80**, 941-956. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(1999\)080\[0941:EOPDOI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(1999)080[0941:EOPDOI]2.0.CO;2)
- [10] 王炳谦, 王芳, 谷伟, 等. 不同养殖密度对褐鳟(*Salmo trutta*)稚鱼生长性能的影响[J]. 东北农业大学学报, 2014, 45(12): 18-23.
- [11] Brown, J.A., Edwards, D. and Whitehead, C. (2010) Cortisol and Thyroid Hormone Responses to Acid Stress in the Brown Trout, *Salmo trutta* L. *Journal of Fish Biology*, **35**, 73-84. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1989.tb03394.x>
- [12] Clarke, L.L. (2009) A Guide to Ussing Chamber Studies of Mouse Intestine. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **296**, G1151-G1166. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90649.2008>
- [13] 周成华, 武玉清, 许正新, 等. 大黄素对小肠运动的影响及其机制[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(12): 1421-1424.
- [14] Lundgren, O., Peregrin, A.T., Persson, K., *et al.* (2000) Role of the Enteric Nervous System in the Fluid and Electrolyte Secretion of Rotavirus Diarrhea. *Science*, **287**, 491-495. <https://doi.org/10.1126/science.287.5452.491>
- [15] 刘雅丹. 世界鲑鳟鱼的养殖和市场现状分析[J]. 科学养鱼, 2004(8): 40-41.
- [16] 廖锐, 区又君, 勾效伟. 养殖密度对鱼类福利影响的研究进展 I 死亡率、生长、摄食以及应激反应[J]. 南方水产科学, 2006, 2(6): 76-80.
- [17] 王文博, 李爱华. 环境胁迫对鱼类免疫系统影响的研究概况[J]. 水产学报, 2002, 26(4): 368-374.
- [18] Hasan, M. and Bart, A.N. (2007) Effects of Capture, Loading Density and Transport Stress on the Mortality, Physiological Responses, Bacterial Density and Growth of Rohu *Labeo rohita* Fingerlings. *Fish Physiology & Biochemistry*, **33**, 241-248. <https://doi.org/10.1007/s10695-007-9136-7>
- [19] 王琨. 氨氮对鲢幼鱼部分组织及血液指标的影响[D]: [硕士学位论文]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2007.
- [20] Barton, B.A., Rahn, A.B., Feist, G., *et al.* (1998) Physiological Stress Responses of the Freshwater Chondrosteian Paddlefish (*Polyodon spathula*) to Acute Physical Disturbances. *Comparative Biochemistry & Physiology Part A*, **120**, 355-363. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(98\)10036-3](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(98)10036-3)
- [21] 孙学亮, 杨树元, 陈成勋, 等. 捕捞胁迫对半滑舌鳎血液生化指标的影响[J]. 长江大学学报(自科版), 2012, 9(4): 28-32.
- [22] 刘小玲. 鱼类应激反应的研究[J]. 水利渔业, 2007, 27(3): 1-3.
- [23] Vyver, J.S.F.V.D., Kaiser, H., Potts, W.M., *et al.* (2013) Using Blood Plasma Cortisol Concentration and Fish Behaviour to Determine Temperature Avoidance in the Estuarine-Dependent Fish Species *Rhabdosargus holubi* Steindachner, 1881 Sparidae. *Journal of Applied Ichthyology*, **29**, 1275-1278. <https://doi.org/10.1111/jai.12268>
- [24] 赵忠波, 胡培培, 刘汝鹏, 等. 运输时间和 MS-222 浓度对翘嘴鲌皮质醇、乳酸及氧气袋内水质的影响[J]. 淡水渔业, 2016, 46(322): 94-98.
- [25] 赵建华. 圆口铜鱼应激生理机制及缓解策略研究[D]: [博士学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- [26] Fast, M.D., Hosoya, S., Johnson, S.C., *et al.* (2008) Cortisol Response and Immune-Related Effects of Atlantic Salmon (*Salmo salar* Linnaeus) Subjected to Short- and Long-Term Stress. *Fish and Shellfish Immunology*, **24**, 194-204. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.10.009>
- [27] Gustke, R.F., McCormick, P., Ruppin, H., *et al.* (1981) Human Intestinal Potential Difference: Recording Method and Biophysical Implications. *The Journal of Physiology*, **321**, 571. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1981.sp014003>
- [28] Ruane, N.M. and Komen, H. (2003) Measuring Cortisol in the Water as an Indicator of Stress Caused by Increased Loading Density in Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, **218**, 685-693. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00422-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00422-2)
- [29] Ellis, T., James, J.D., Sundhm, H., *et al.* (2007) Non-Invasive Measurement of Cortisol and Melatonin in Tanks Stocked with Seawater Atlantic Salmon. *Aquaculture*, **272**, 698-706. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.07.219>

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2373-1443，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：ojfr@hanspub.org