

摄食水平和温度对日本鳗鲡耗氧率 与 ETS 活性的影响

丁益群^{1,2} 刘小玲¹ 雷思佳²

1. 华中农业大学水产学院/农业部淡水生物繁育重点实验室, 武汉 430070;

2. 深圳职业技术学院应用化学与生物技术学院, 深圳 518055

摘要 分别在不同温度(22、27、32 °C)以及不同摄食水平(饥饿、1%、2%、饱食)条件下对日本鳗鲡的 ETS 活性(A_{ETS})和耗氧率(R)进行测定。研究表明,在饱食状态下,鳗鲡的耗氧率、ETS 活性随着温度升高而增加,但 R/A_{ETS} 值基本恒定,保持在 0.38 左右;同时,在 27 °C 温度下,随着摄食水平(L_R)的增高,鳗鲡的耗氧率、ETS 活性也随之增高,并且 R/A_{ETS} 值也呈现出相应增高的趋势,其具体关系如下: $R/A_{ETS} = 0.0463 L_R + 0.2495 (r^2 = 0.8232)$ 。

关键词 日本鳗鲡; ETS 活性; 耗氧率; 温度; 摄食水平

中图分类号 Q 591; S 91 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)05-0095-05

代谢能的测定是生物能量学(bioenergetics)研究中最重要的一环之一。由于呼吸作用是生物体代谢的中心,鱼体耗氧率在很大程度上反映了鱼体的代谢水平,故而可以作为衡量鱼体代谢能的一个指标。ETS(respiratory electron transport system)是呼吸链中的一个电子传递系统,在电子传递链中包含一个复杂的多酶体系,因此,ETS 活性(A_{ETS})通常通过电子传递过程中某一限速酶的活性来表达。由于在特定环境条件下生物的耗氧率(oxygen consumption rate, R)与 ETS 活性相对恒定,所以可以利用 ETS 活性与耗氧率之间的经验关系,将 ETS 活性换算成耗氧率。Packard^[1]首次采用测定 ETS 活性的方法,间接测得浮游植物的呼吸率。现在普遍使用 INT-甲贍法, Owens 等^[2]、King 等^[3]、Packard 等^[4]都对此方法做了相关报道,并进行了不断改进,逐渐将其方法应用到水体中细菌、浮游植物、浮游动物、底栖生物、鱼类以及沉积物等的耗氧率研究中去。

鳗鲡(*Anguilla japonica*)肉质细嫩,味道鲜美,含有丰富的脂肪及维生素 A,具有相当高的营养价值和经济价值,是广东、海南、福建等地区的主要经济养殖品种之一。有关鳗鲡养殖的各方面报道^[5-9]已有很多,本研究通过测定不同条件下鳗鲡

ETS 活性与耗氧率的关系,探讨 ETS 活性测定法在鳗鲡生物能量学研究中的应用,为鳗鲡健康养殖模式的建立提供依据。

1 材料与方 法

1.1 试验鱼来源及驯化

试验用日本鳗鲡购自广东顺德三洲鳗鲡养殖场,放养于深圳职业技术学院应用化学与生物技术学院实验室,设置大小相同的控温水槽,水体用上海华辰 WMZK-01 型温控仪进行控温,并在水槽中放置水泵以形成循环水流。每个水槽放置 5 个规格相同的小水族箱(35 cm×55 cm×30 cm),温度组是在饱食条件下,按照不同温度(22、27、32 °C)分为 3 个试验;摄食组是在水温 27 °C 的条件下,按照不同摄食水平(饥饿、1%、2%、饱食)分为 4 组进行试验。整个能量收支试验周期均为 8 周,每个试验组(包括饥饿组)鳗鲡驯养 3 周后随机采样进行耗氧率以及 ETS 活性的测定。养殖水源为曝气 2 d 以上的自来水,水体 pH 值控制在 7.5~8.0,溶解氧保持在 8 mg/L 以上。

收稿日期: 2012-11-07

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动经费项目(2409K3070002)和深圳市科技计划项目(07KJBA166)

丁益群, 硕士研究生。研究方向: 鱼类能量学。现工作单位: 北京桑普生物技术有限公司。E-mail: alexding1984@163.com

通讯作者: 雷思佳, 博士, 教授。研究方向: 水产动物生理生态学。E-mail: 1318739818@qq.com

1.2 耗氧率的测定

按实验设计的不同条件将试验鱼分组,待各组鳗鲡完全摄食后(投喂后 1 h 左右)将试验鱼体放入 10 L 的呼吸瓶中适应 3 h,每个呼吸瓶放置 1 尾,设置 3 个平行组,每组测定 3 次。称鱼体质量,同时将每组各瓶倒出少许水至空白瓶中,作为空白对照。分别测定各呼吸瓶与空白瓶的初始溶氧(N_0),然后全部密封,每间隔 1 h 测定水样瓶中溶氧,求得连续 2 次的浓度差,取其平均值。水体溶解氧采用 Winkler 碘量法进行测定。

1.3 ETS 活性的测定

测定鳗鲡的耗氧率后,立即将鱼体转至 0~4 °C 条件下(冰板上)解剖,取 1 g 左右肌肉样本放置于干燥洁净的陶瓷研磨皿中,迅速倒入少量液氮将肌肉组织冷冻并磨碎;将样品装入 5 mL 离心管在 12 000 r/min 的转速下低温(0~4 °C)离心 20 min,取上清液 1 mL 加入 3 mL 反应基质,然后加入 1 mL INT 试剂并反应 20 min;待反应结束后,加入 1 mL 阻断剂(阻断剂为 1:1(V/V)1 mol/L H_3PO_4 和丙酮的混合液)停止反应,2 h 后用分光光度计在 490 nm 波长下测定其吸光度值。另做一浑浊空白和基质-INT 空白纠正结果。

浑浊空白:1 mL 游离细胞+4 mL 缓冲液+1 mL 阻断剂

基质-INT 空白:1 mL ETS-B 缓冲液+3 mL 基质+1 mL INT 后反应 20 min

INT-甲臌法是在对破碎细胞提供过量反应基质(NADH、NADPH、琥珀酸)的条件下,以 INT(氯化 2-对碘苯 3-对硝基苯 5-苯基四氮唑)作为外来电子受体,来收集 ETS 传递的电子。当 INT 被还原成甲臌(formazan)后,可在 490 nm 处用分光光度计测其消光值,得出 ETS 活性,再根据 ETS 活性与 R 值之间的关系,把 ETS 活性换算成耗氧率^[10]。

表 1 温度对日本鳗鲡耗氧率与 ETS 活性的影响¹⁾

Table 1 Effect of temperature on the ETS activity and oxygen consumption rate in *Anguilla japonica*

温度/°C Temperature	鱼体质量/g Body weight	耗氧率/(mg/(g·h)) R	ETS 活性/(mg/(g·h)) A_{ETS}	R/ A_{ETS}
22	17.48±0.66 a	0.105±0.003 a	0.266±0.008 a	0.390±0.003 a
27	17.17±0.75 a	0.144±0.008 b	0.365±0.022 b	0.397±0.003 a
32	17.26±1.82 a	0.157±0.008 b	0.403±0.020 c	0.396±0.004 a

由于机体内酶的活性对外界环境的变化有一个反应阶段,因此其值在机体中会保持一段时间的相对稳定,相比直接测定耗氧率更能有效反映出机体一段时间内的代谢情况。同时从理论上讲, R/A_{ETS} 值是稳定的,利用 ETS 活性法测定耗氧率具有更高的灵敏性和精确度。

本试验对 ETS 活性测定以及计算的方法,参照 David^[11]对 Owens 等^[2]实验法的改进方法,得到 ETS 活性计算公式如下:

$$A_{ETS}(\text{mg}/(\text{g}\cdot\text{h})) = \frac{A}{15.9} \times \frac{60}{T} \times \frac{V \times H}{S \times M} \times 32/2^{[10,12]}$$

H: 研磨后的体积, mL; V: 反应阻断后试剂的最终体积, mL; A: 吸光度减去浑浊空白以及基质-INT 空白; M: 肌肉样本质量, g; S: 参加反应的上清液的体积, mL; I: 反应的时间, min。

1.4 数据处理

试验数据以平均值±标准差表示,采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,以 Duncan 多重比较法检验组间差异, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 温度对日本鳗鲡耗氧率以及 ETS 活性的影响

如表 1 显示,当养殖温度为 22 °C 时,日本鳗鲡的 R 值和 ETS 活性明显比其他 2 个温度组的低,但 27 °C 和 32 °C 2 个温度组的日本鳗鲡,其 R 值的变化程度与 22 °C 组的相比,变化并不明显。不同养殖温度组的 ETS 活性也表现出显著差异($P < 0.05$),随着温度升高,ETS 酶的活性也升高。但是, R/A_{ETS} 值却没有随温度的改变表现出显著差异($P > 0.05$),其比值稳定在 0.39 左右。温度(T)与 R 以及 ETS 活性的回归方程分别如下:

$$R = 0.0052T - 0.0045 (r^2 = 0.7796)$$

$$A_{ETS} = 0.0137T - 0.026 (r^2 = 0.8852)$$

1) 同一列中数据后字母不同者表示差异显著($P < 0.05$)。下同 Values in each row without a common superscript are significantly different ($P < 0.05$). The same as below.

2.2 摄食水平对日本鳗鲡耗氧率以及 ETS 活性的影响

摄食水平对日本鳗鲡耗氧率以及 ETS 活性的影响结果列于表 2, 方差分析表明, 不同摄食水平组的鳗鲡 R 以及 ETS 活性均表现出显著差异 ($P < 0.05$), 随着摄食水平从 0 到饱食不断提高, 其 R 值以及 ETS 活性均随之升高。同时, 不同摄食水平组鳗鲡的 R/A_{ETS} 值也有显著差异 ($P < 0.05$)。表 2 中日本鳗鲡按不同摄食水平驯养 8 周后, 饥饿

组的鱼体质量与其他 3 组相比, 表现出明显的差异。但后 3 组鱼体的质量水平差异并不明显, 对体质量进行协方差分析后, 发现鱼体质量对不同摄食水平与 R/A_{ETS} 的关系的影响没有显著差异 ($P > 0.05$)。

摄食水平 (L_R) 与 R , ETS 活性以及 R/A_{ETS} 的回归方程分别如下:

$$R = 0.0259 L_R + 0.0582 (r^2 = 0.9125)$$

$$A_{ETS} = 0.0366 L_R + 0.2425 (r^2 = 0.9045)$$

$$R/A_{ETS} = 0.0463 L_R + 0.2495 (r^2 = 0.8232)$$

表 2 摄食水平对日本鳗鲡耗氧率与 ETS 活性的影响

Table 2 Effect of ration level on the ETS activity and oxygen consumption rate in *Anguilla japonica*

摄食水平 Ration levels	鱼体质量/g Body weight	鱼体质量范围/g Body weight range	耗氧率/(mg/(g·h)) R	ETS 活性/(mg/(g·h)) A_{ETS}	R/A_{ETS}
饥饿 Starvation	8.92±0.67 a	8.26~9.44	0.063±0.005 a	0.248±0.006 a	0.254±0.013 a
1%	17.17±0.75 b	16.61~17.93	0.080±0.004 b	0.276±0.007 b	0.291±0.011 b
2%	16.71±0.75 b	16.25~17.03	0.103±0.001 c	0.304±0.015 c	0.338±0.017 c
饱食 Satiation	17.17±0.75 b	16.61~17.93	0.144±0.008 d	0.365±0.022 d	0.397±0.003 d

3 讨论

3.1 环境因子对耗氧率、ETS 活性及其比值的影响

环境因子对生物代谢活动以及 ETS 活性的影响, 已经有很多学者进行了研究^[9-13]。King 等^[3]发现在从不断增加大气压的过程中, 试验浮游动物的 ETS 活性和呼吸作用均未产生显著影响; Bamstedt^[14]发现汤氏纺锤水蚤在盐度为 1.8%~4.3% 的变化范围内, ETS 活性和耗氧率亦无显著变化; 而 Devol^[15]在北大西洋西部对缺氧层 ETS 活性垂直分布的研究中发现, 氧分压最低处 ETS 活性最高。

试验中, 在研究温度对鳗鲡耗氧率影响时发现, 随着养殖水体温度的升高, 鱼体耗氧率也随之升高。同时温度的变化, 从理论上讲会引起调节生物耗氧率相关酶活性的变化, 本试验研究发现鳗鲡 ETS 的活性也随着温度的升高而增高, 与 Schalk 等^[8]的结论一致。但 Packard 等^[4]在研究温度对太平洋西部海区浮游动物种群 ETS 活性的影响时并未发现这种预期的变化, 这可能是由于温度对浮游动物和小型浮游生物的 ETS 活性影响较小所造成的。对于 R/A_{ETS} 值, 试验结果并未显示温度对此有显著影响, David 等^[11]研究发现沙筛贝 R/A_{ETS} 值随着温度的上升而降低, 与本试验结果不同, 但他指出此变化更可能是由于食物品质的改变而造成的, 其值受温

度变化的影响并不明显。同时也可能是因为在这些试验中, 提供的温度均未达到机体代谢活动以及体内 ETS 酶的最适温度, 在此温度范围内, 两者都随着温度的升高表现出相对平行的上升趋势, 因此, R/A_{ETS} 值也表现出相对稳定。

3.2 生理因子对耗氧率、ETS 活性及其比值的影响

有关不同生理状态对鱼类耗氧率的研究较多, 同时机体生理状态的改变也会对其 ETS 活性产生影响。Marshall 等^[16]研究发现, 飞马哲水蚤性成熟个体的耗氧率比性未成熟者高出 40% 左右, 虽然该研究并未对生殖状态是否会对其 ETS 活性产生影响进行进一步的分析, 但对比在不同生殖条件下鱼体体内同工酶活性可能会有所不同, 我们可以推断 ETS 活性及 R/A_{ETS} 值可能会受到鱼体生殖状态的影响。

本试验研究结果显示, 当鱼体处于摄食不足或长期饥饿状态时, 其耗氧率及 ETS 活性均降低, 并且 R/A_{ETS} 值也随着摄食水平的降低而降低, 其值与摄食水平的关系式为: $R/A_{ETS} = 0.0463 L_R + 0.2495$ 。这可能是由于在长期饥饿状态下, 鱼体会通过调节代谢水平等较为直观的方法来适应饥饿状态, 此时耗氧率下降的程度会非常大, 汤洪芬等^[17]研究发现, 鲑鱼幼鱼在饥饿 60 d 后其静止耗氧率下降了 65% 左右。而与此同时, 在长期饥饿条件下, 鱼体会先消耗体内存储的营养物质, 为 ETS 提供部

分反应底物与能量,缓解了 ETS 活性的下降程度,从而导致了 R/A_{ETS} 值的较大变化,在长期饥饿状态下,鱼体的 R/A_{ETS} 值会比饱食状态下低得多。

3.2 耗氧率与 ETS 活性的关系及其应用

Yamashita 等^[9]认为,ETS 活性表示的是生物在最适条件下的最大潜在耗氧能力,当 R 和 ETS 活性采用的单位一致时, R/A_{ETS} 比值反映了生物利用呼吸潜能的分数的,因此从理论上讲, R/A_{ETS} 值是稳定的^[8]。有关耗氧率和 ETS 活性关系的研究,已有很多学者对浮游动物、桡足类进行了大量研究^[1-4],鱼类的则相对较少,研究结果表明在不同生物种类之间,其 R/A_{ETS} 值可能会有所不同,而在相同的种类之间,其 R/A_{ETS} 值也可能存在差异。King 等^[3]在研究桡足类时发现,个体大小对 R/A_{ETS} 值有显著影响,个体大小为 $100 \sim 200 \mu\text{m}$ 左右的桡足类,其 R/A_{ETS} 值大小比 $1\ 000 \mu\text{m}$ 以上的桡足类高出 $8 \sim 9$ 倍,而相近个体之间的偏差并不大。Owens 等^[2]也发现,处于不同发育期的太平洋哲水蚤,其 R/A_{ETS} 值也不尽相同。本试验研究结果发现,在水温 $22 \sim 32 \text{ }^\circ\text{C}$ 范围内,饱食状态下的日本鳀,其 R/A_{ETS} 值保持相对稳定($K=0.381\ 3$),但是对于处于不同摄食水平的鳀,其 R/A_{ETS} 值又存在显著的差异。由此可见,在实际条件下, R/A_{ETS} 值很难保持稳定,可能仅对于生理条件相同或者相近的个体存在相对稳定,而由于环境因素、生理因素等因子的改变,均可能会对其比值造成影响。

目前国内有关鱼类 ETS 活性及其应用的研究还相对较少,大多则是测定污泥 ETS 活性的研究。本试验的研究结果表明鱼类 R/A_{ETS} 值会受不同因子的影响,在不同种类之间其影响更为显著。 R/A_{ETS} 值的稳定,只是对于特定生物,在特定条件下生物的耗氧率与 ETS 活性相对恒定,因此其值相对稳定。在今后的研究中,尤其是在野外条件下,可以广泛利用 R 与 ETS 活性之间这种稳定的经验比值来估算耗氧率,可以极大地简便耗氧率的测定工作,也更具有准确性。通过试验得出在养殖条件下鱼体的 R/A_{ETS} 值,对于鱼类生物能量学中代谢能的研究,尤其是在自然水体中鱼体代谢能的测定及计算,进而准确得出能量收支方程,将其广泛应用于生产养殖,具有十分重要的意义。

参 考 文 献

- [1] PACKARD T T. The measurement of respiratory electron transport activity in marine plankton[J]. Marine Research, 1971,29(3):235-244.
- [2] OWENS T G, KING F D. The measurement of respiratory electron-transport-system activity in marine zooplankton[J]. Marine Biology, 1975,30(1):27-36.
- [3] KING F D, PACKARD T T. The effect of hydrostatic pressure on respiratory electron transport system activity in marine Zooplankton[J]. Deep-Sea Research, 1975,22(2):99-105.
- [4] PACKARD T T, DEVOL A H, KING F D. The effect of temperature on the respiratory electron transport system in marine plankton[J]. Deep-Sea Research, 1975,22:237-249.
- [5] 管卫兵,丁华腾,宣富君,等.长江口环境条件对日本鳀(*Anguilla japonica*)鳀苗溯河洄游的影响[J].海洋通报,2009,28(3):65-69.
- [6] 关瑞章,李忠琴,郭松林,等.4种中药三联用对鳀致病菌的抑制作用[J].华中农业大学学报,2011,30(6):764-767.
- [7] 何英,袁重桂,阮成旭.莫桑比克鳀对温度、盐度和 pH 的耐受性试验[J].水产科学,2009(4):222-224.
- [8] SCHALK P H. Respiratory electron transport system (ETS) activities in zooplankton and micronekton of the Indo-Pacific region[J]. Marine Ecology Progress Series, 1988,44(1):25-35.
- [9] YAMASHITA Y, BAILEY K M. Electron transport system (ETS) activity as a possible index of respiration for larval walleye pollock *Theragra chalcogramma* [J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1990,56(7):1059-1062.
- [10] 张武昌. ETS 活性和呼吸作用[J].海洋科学,1999(3):21-24.
- [11] DAVID L F, THOMAS F N, THOMAS H J. Seasonal changes in the respiratory electron transport system (ETS) and respiration of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* in Saginaw Bay, Lake Huron[J]. Hydrobiologia, 2001,448:61-70.
- [12] 汤鸿,李少普,王桂忠.电子传递系统(ETS)活力测定法及其在海洋生态系统中的应用[J].海洋通报,1994,13(4):76-83.
- [13] TATJANA S, FRANJA P, ANTON B. Electron transport system activity and oxygen consumption of two amphibious isopods, epigeal *Ligia italica* Fabricius and hypogean *Titanethes albus* (Koch), in air and water[J]. Marine and Freshwater Behaviour and Physiology, 2010,43(2):149-156.
- [14] BAMSTEDT U. ETS activity as one estimator of respiratory rate of zooplankton populations; the significance of variations in environmental factors[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1980,42:267-283.

- [15] DEVOL A H. Respiratory electron transport activity and adenosine triphosphate in the oxygen minimum of the eastern tropical North Pacific[J]. *Deep-Sea Research*, 1976, 23: 963-973.
- [16] MARSHALL S M, NICHOLLS A G, ORR A P. On the biology of *Calanus finmarchicus*: X. Seasonal changes in oxygen consumption[J]. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1958, 37(2): 459-472.
- [17] 汤洪芬, 曹振东, 付世建. 饥饿对鲑鱼幼鱼静止代谢率的影响[J]. *重庆师范大学学报: 自然科学版*, 2007, 24(1): 72-75.

Effect of ration level and temperature on oxygen consumption rate and ETS activity in *Anguilla japonica*

DING Yi-qun^{1,2} LIU Xiao-ling¹ LEI Si-jia²

1. *College of Fisheries, Huazhong Agricultural University/Key Lab of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture, Wuhan 430070, China;*

2. *School of Applied Chemistry and Biological Technology, Shenzhen Polytechnic College, Shenzhen 518055, China*

Abstract ETS activity and oxygen consumption rate (R) of the Japanese eel, *Anguilla japonica*, were determined at different temperature (22, 27 and 32 °C) and ration levels (starvation, 1%, 2% and satiation). On satiation, the ETS activity and R increased with the increasing of temperature, but the R/A_{ETS} ratio was not significantly affected by temperature, with the value maintained at about 0.38. While at 27 °C, the ETS activity, R and the R/A_{ETS} ratio increased with the increasing of ration level. The regression relation between ration level and R/A_{ETS} was: $R/A_{ETS} = 0.0463 L_R + 0.2495 (r^2 = 0.8232)$.

Key words *Anguilla japonica*; ETS activity; oxygen consumption rate; temperature; ration level

(责任编辑: 边书京)