

178Hz 正弦波对刺参行为、呼吸及免疫应答的影响

蒋薇¹, 梁振林², 姜朝阳², 黄六一¹

(1. 中国海洋大学 水产学院 海洋渔业系, 山东 青岛 266003; 2. 山东大学(威海), 山东 威海 264209)

摘要: 根据山东荣成沿岸风电机组产生的声波范围选取其中 178Hz 的峰值声音, 声压级控制于 (85±5)dB, 在实验室水槽中, 采用实验生态学方法研究了 178Hz 声波影响下的刺参(*Apostichopus japonicus*) 幼参的行为反应、耗氧率以及体腔液抗氧化酶(CAT、SOD)浓度的变化。通过平均聚集率的变化比较, 发现刺参对 178Hz 的声波胁迫环境的行为反应敏感; 利用空瓶法测得幼参耗氧率显著低于对照组($P<0.05$); 通过测定刺参体腔液免疫活性发现在该频率声波干扰下的刺参 CAT 活性显著高于对照组($P<0.05$), 而 SOD 活性于对照组差异不明显($P>0.05$)。研究结果说明声波对刺参幼参的呼吸和免疫会产生明显影响, 可为我国近海刺参养殖和风电发展策略提供参考。

关键词: 刺参(*Apostichopus japonicus*); 风电; 声波; 耗氧率; 过氧化氢酶; 超氧化物歧化酶

中图分类号: S917.4 文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2016)12-0019-05

doi: 10.11759/hyxx20130507003

近年来, 风能作为一种清洁的可再生资源, 越来越受到我国和世界各国的重视。随着我国社会经济的快速发展对能源的大量需求, 以近海风力发电场必将成为我国未来发展近海工程的重点^[1]。然而, 风力发电场的兴建在一定程度上必然会破坏我国近海海洋生态环境和资源。由于风电发电机组运行时会产生一定频率的声波, 从而对近海自然生长的海洋生物以及养殖生物的生长存活造成一定程度的影响。目前, 已有近海捕捞渔民和水生经济动物养殖户反应风电的兴建已经造成捕捞产量下降以及一些养殖生物的死亡。曾有文献叙述过钻井噪声以及水下施工爆破对水生生物的摄食生长和生理的影响^[2-4], 本文选取我国近海风电机组产生的 178 Hz 的峰值频率声波作为实验的影响因子, 选取我国北方沿岸最具代表性的海水增殖养殖品种刺参为研究对象, 通过对比刺参初期的行为反应, 初步研究噪声胁迫对刺参呼吸生理和免疫生理的影响, 为我国近海刺参养殖和风电发展策略提供参考。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验刺参均取自山东省威海市寻山集团公司人工繁育的 1 龄刺参, 体质量为(8.0±0.7)g, 体表呈青黑色, 肉刺发达。采用 10℃左右的低温运输, 保证刺参运输过程中不受伤害^[5]。在水槽中暂养 15 d, 每日

6:00 吸取残饵, 18:00 喂食, 幼参饲料为寻山集团配制的配合饲料。

1.2 试验设备与装置

在山东大学威海分校海洋学院海洋生物繁育综合实验室内进行实验, 该实验室的养殖用水净化系统一定程度上保证养殖用水的温度, 盐度, 无机盐, 微生物等含量基本处于稳定状态。实验室具备多个规格为 200 mm×100 mm×50 mm 的实验水槽。

声学仪器皆借自大连水产学院水声学实验室。信号发生器为 nF 公司生产, 型号为 WF1946B。水下声源与放大器为 UETAX 公司生产, 型号为 UA-311。水听器的生产厂家为 OKI, 型号为 SW1030。

1.3 实验方法

1.3.1 声波调查

选取建造风电较有规模且围海养殖业发达的山东省荣成市东褚岛附近海区, 录音分析出当地风电声波的主要三种音频信号, 分别为 80, 178, 750 Hz。本次实验选取其中 178 Hz 频率的声波为干扰因子对刺参进行声波驯化, 并测得 178 Hz 频率声波的声压

收稿日期: 2015-06-12; 修回日期: 2016-01-29

基金项目: 威海市科技攻关项目(2013)

[Foundation: Science and technology project of Weihai city (2013)]

作者简介: 蒋薇(1987-), 女, 硕士研究生, 增殖养殖工程, E-mail: chiangv1022@gmail.com; 梁振林, 通信作者, 教授, 博士生导师, E-mail: liang@ouc.edu.cn

为 85 dB。

通过信号发生器, 放大器, 以及水下音响于实验室内模拟声波干扰。考虑到水下音响的使用寿命以及刺参的一日之内活动能力的变化^[6], 每日的放声时间定为 12: 00~20: 00。

1.3.2 实验设计与测定方法

水槽内养殖用循环水的温度为 20℃, 盐度为 33, 溶解氧含量为 6 mg/L 以上^[7]。

行为学实验实验方法: 试验期间, 每天测量养殖水槽内基本水质指标。实验装置的布置如图 1。声源的位置位于水体正中央处。在养殖水槽槽底部放置 8 个相同规格的波纹板。本次实验所用的波纹板为 PVC 材料, 厚度为 1 mm, 放置于上底为 400 mm×400 mm, 下底为 300 mm×300 mm, 高为 400 mm 的四棱台型波纹框中。实验开始前, 预先将实验幼参平均播撒在 8 个波纹板上, 每个波纹板上放置 144 只规格为(4.68±0.59) g 的幼参, 观察和记录刺参的分布情况, 待每日刺参平均分布无明显变化之后开始放声。将每组的实验周期定为 12 d, 第 1~6 天利用上述声波发生装置放声, 第 7~12 天关闭声源停止放声。在此期间, 每 2 h 观察和记录一次刺参分布情况。

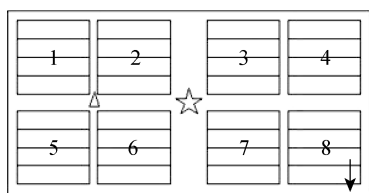


图 1 幼参行为实验布置图

Fig. 1 Experimental arrangement of young *Apostichopus japonicus*

△. 声源放置处; △. 出水口位置; △. 入水口位置; △. 波纹板框放置位置; 其内横线为框内波纹板的放置位置

△. Paced at sound source; △. Delta for water inlet outlet position; △. Lower position; △. Placement of corrugated plate; Line position of box of corrugated plate

耗氧率与免疫酶活性实验: 因室内实验的实验动物样本数以及饲养空间存在限制, 当实验过程中一定量的刺参吐脏死亡时, 需停止实验, 减少系统误差, 故耗氧率与免疫酶活性实验选择 10 d 为实验周期, 分别设置对照组与胁迫组。将每组 300 头刺参与水下声源放入同一养殖水槽内, 水下声源位置在水体的正中央。

耗氧率测定: 用空瓶法测定刺参幼参的耗氧率。每隔一日测量一次。实验组和对照组各设置 5 组重复和一组空白, 每组重复为 250 mL 锥形瓶中放一头

幼参, 灌满海水并用保鲜膜封好瓶口。空白组同样采用 250 mL 锥形瓶封好瓶口, 其内不设刺参。实验前取水样作为初始值, 4 h 后再取水样作为终末值。水样中的溶解氧采用碘量滴定法(海洋调查规范, GB12763.4-2007)测定。将锥形瓶中的刺参取出, 在 60℃ 烘干至恒质量, 用 MP-120 型天平测量其体质量。

抗氧化酶实验: 实验周期为 10 d。每日放声结束后, 从实验组刺参和对照组各取 5 只刺参从养殖水槽内取出, 先用纱布吸干刺参表面的水分, 然后将其置于解剖盘内, 用解剖剪沿刺参腹部逐头剪开, 然后迅速用灭菌枪头吸取刺参体腔液, 分别置于 5 mL 离心管中, 迅速放入 -80℃ 冰箱中保存备测。CAT 以及 SOD 活性测定均采用南京建成生物科技有限公司生产的试剂盒。

1.3.3 数据处理方法

实验所计算的聚集率为实验中某固定时间点刺参聚集在波纹板表面、底部及其内部的数量与实验中刺参总数量的比值; 平均聚集率(mean attractive rate, MAR)是指实验中某固定时间段内刺参聚集在波纹板内部、底部和表面的数量之和与实验中刺参总数量的比值的平均值, 计算公式为:

$$R_{MA} = \sum_i^n \frac{N_i}{nN} \times 100\%$$

式中, N_i 为各固定时间点第 $i(i=1, 2, \dots, n)$ 次聚集刺参的数量, N 为实验刺参总数, n 为实验记录次数。

耗氧率 [R_{OC} , mL/(g·h)] 计算采用以下公式^[8]:

$$R_{OC} = (C_0 - C_t) V / WT$$

C_0 、 C_t 分别为空白瓶与实验结束后溶解氧含量(mL/L), V 为样品瓶容量(L), W 为刺参湿体质量(g), T 为实验持续时间(h)。

抗氧化酶 CAT 与 SOD 活性的测定和计算方法参照试剂盒说明书。

用 SPSS19.0 进行统计分析。利用 T 检验(student's T test)比较分析刺参在声波胁迫前后的平均聚集率的变化以及实验组和对照组间耗氧率和抗氧化酶活性的差异。

2 结果与分析

2.1 声波胁迫对刺参行为反应的影响

如图 2 所示, 178Hz 声波胁迫前后 1~8 号波纹板上刺参的平均分布率的变化情况如下。经 SPSS19.0 分析得出刺参在停止放音之后, 3 号波纹板, 6 号波纹

板, 7号波纹板的平均分布率显著高于声波胁迫时的平均分布率($P<0.05$)。而8号波纹板上刺参的平均分布率显著低于声波胁迫时的平均分布率($P<0.05$)。另外, 实验观察发现, 进行放声时在靠近8号波纹板的入水口处水槽壁上明显比放声结束后聚集了更多的刺参。

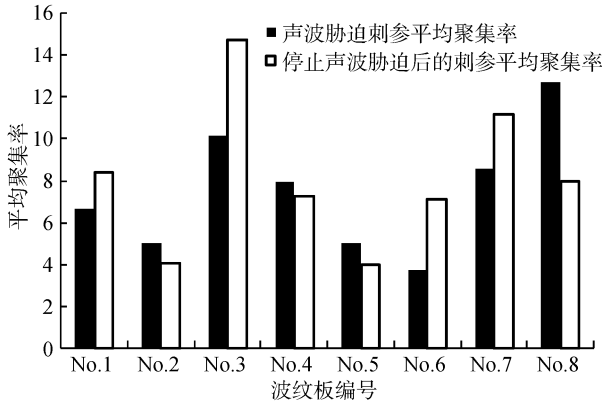


图2 声波胁迫下刺参平均聚集率的变化

Fig. 2 Change in acoustic stress average aggregation rate of *Apostichopus japonicus*

2.2 声波胁迫对刺参呼吸代谢的影响

通过刺参幼参对声波胁迫的行为学实验初步探索了刺参对声波胁迫的行为反应, 故需要进行耗氧率和酶活性的实验研究进一步探索在频率为178Hz的声波持续胁迫下, 幼参的代谢以及免疫应答机制。通过耗氧率的实验研究发现: 胁迫组幼参在实验周期内耗氧率(R_{OC})的平均值为 $(0.00759\pm 0.00051)\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$, 对照组幼参的耗氧率的平均值则为 $(0.011465\pm 0.000099)\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 。且随着实验的进行, 胁迫组幼参的耗氧率与对照组幼参的耗氧率存在显著差异(图3)。

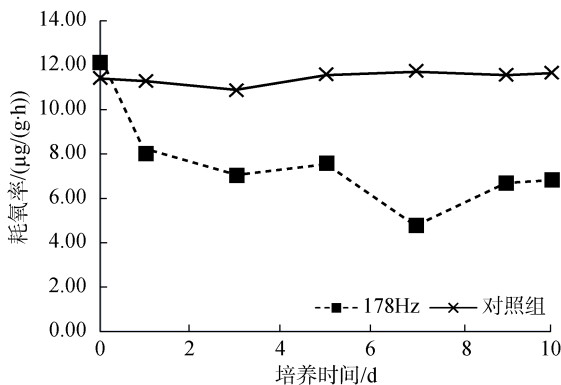


图3 178Hz的声波对幼参耗氧率的影响对比

Fig. 3 Effect of acoustic wave on oxygen consumption rate of young *Apostichopus japonicus* at 178 Hz

刺参的耗氧率呈现先减小后增大的U形曲线变化模式, 但均显著低于对照组($P<0.05$)。第7天时耗氧率最小, 且与对照组差异极显著($P<0.01$)。至实验结束时耗氧率仍显著低于对照组($P<0.05$)。

2.3 声波胁迫对幼参体腔液CAT活性的影响

如图4所示, 胁迫组幼参体腔液CAT活性的平均值为 $(8.61583\pm 0.44778)\text{U}/\text{mL}$, 对照组则为 $(4.88501\pm 0.13411)\text{U}/\text{mL}$ 。胁迫组体腔液CAT活性显著高于对照组($P<0.05$), 其中最大值出现在第4天时, 最小值则出现在实验的第5天。

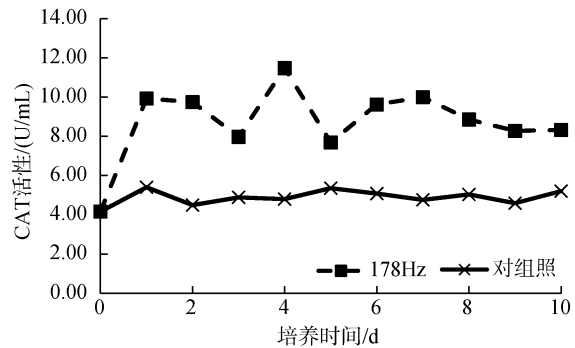


图4 不同频率的声波对幼参体腔液中CAT活性的影响
Fig. 4 Effects of different frequencies of sound waves on CAT activity in young *Apostichopus japonicus*

2.4 声波胁迫对幼参体腔液内SOD活性的影响

如图5所示, 胁迫组幼参体腔液SOD活性为 $(47.82845\pm 0.60407)\text{U}/\text{mL}$, 对照组幼参体腔液SOD活性为 $(48.37594\pm 0.39085)\text{U}/\text{mL}$ 。

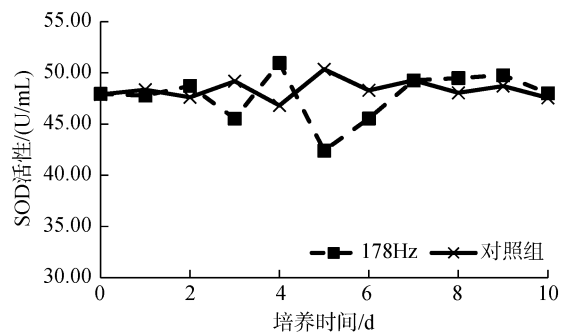


图5 不同频率的声波对幼参体腔液SOD活性的影响
Fig. 5 Effects of different frequencies of sound waves on SOD activity in young *Apostichopus japonicus*

在178Hz声波的处理组中, 幼参体腔液SOD活性除第5天外, 其他皆于对照组SOD活性差异不显著($P>0.05$), 其中最大值出现在第4天, 最小值出现

在第 5 天。

3 讨论

通过对比声波胁迫前后刺参幼参的平均分布情况表明刺参对 178 Hz 的声波胁迫环境反应敏感。实验发现刺参有向着远离声波的方向移动的趋势,表明幼参能够感知该频率声波并且在面临该频率声波胁迫时能够作出逃避反应。

刺参缺乏获得性免疫系统,幼参减少呼吸代谢是对环境变化进行适应和自我保护的一种应激机制。Ji^[9]研究了饥饿以及夏眠(温度)对刺参呼吸耗氧的影响,发现在饥饿以及夏眠状况下刺参耗氧率均呈现逐渐减少趋势。声波被认为是物理环境胁迫中的一种,张引江等^[10]研究表明振动可能对金鱼产生不可逆的生理反应,表明低频振动导致金鱼体内某器官功能衰竭。声波胁迫组的刺参幼参耗氧率显著低于对照组,引起其耗氧率下降的原因可能有以下两种:(1)声波振动在胁迫幼参过程中,对其机体组织产生了某种不可逆的生理反应导致刺参无法进行正常的呼吸代谢。从而使得刺参的呼吸代谢有所回升^[11-13];(2)在实验进行到后期,胁迫组陆续发现胁迫组幼参有吐脏和死亡现象,推测声波振动对幼参呼吸树造成损坏之后,幼参只能通过皮肤进行呼吸,则耗氧量必然减小^[14]。

刺参缺乏获得性免疫系统,其免疫系统为非特异性免疫系统。体腔中的体腔液,功能类似于淋巴,其中含有大量的参与免疫反应的免疫细胞^[15-16]。对于棘皮动物而言,反应氧中介物是体腔细胞受到刺激后产生的活性氧物质,机体通过产生反应氧中介物抵抗外界生物侵袭,是免疫防御的一种普遍机制。而本次实验中声波胁迫时刺参的免疫酶活性变化表明:(1)臧元奇等^[14]发现养殖环境中存在一定浓度的氨氮有利于刺参免疫酶活性的提高。赖廷和等^[15]发现一定浓度的重金属 Cd 的胁迫能够刺激红树蚬体内的抗氧化酶产生。因此,一定程度上的环境胁迫能够提高刺参体内免疫酶活性。(2)本次实验中,在声波的胁迫下 CAT 和 SOD 的活性变化呈现不一致性,也再次证明该两种酶在功能上存在不同^[16]。

参考文献:

[1] 黄维平,刘建军,赵战华.海上风电基础结构研究现状及发展趋势[J].海洋工程,2009,27(2):130-134.
Huang Weiping, Liu Jianjun, Zhao Zhanhua. Research status and development trend of offshore wind power

infrastructure [J]. Ocean Engineering, 2009, 27 (2): 130-134.

[2] 孙耀,陈民山,陈聚法,等.石油钻井噪声与振动对鲤鱼(Cyprinus carpio)能量收支的影响[J].生态学报,2008,28(8):3527-3534.
Sun Yao, Chen Minshan, Chen Jufa, et al. Poly law, oil drilling noise and vibration on common carp (Cyprinus carpio) the energy budget of [J]. Journal of Ecology, 2008, 28 (8): 3527-3534.

[3] 李文涛,张秀梅.水下爆破施工对鱼类影响的估算及预防措施[J].海洋科学,2003,21(11):20-23.
Li Wentao, Zhang Xiumei. Estimation and preventive measures for the impact of underwater blasting on fish [J]. Marine Science, 2003, 21 (11): 20-23.

[4] 孙耀,姜尚亮.钻井噪声与振动对草鱼摄食和生长转换效率的影响—Eggers 胃含物法在现场模拟研究中的应用[J].生态学报,2001,21(12):2153-2158.
Sun Yao, Jiang Shangliang. The effect of drilling noise and vibration on the feeding and growth conversion efficiency of grass carp Eggers gastric content method in the field simulation study [J]. Journal of Ecology, 2001, 21 (12): 2153-2158.

[5] 常忠岳,衣吉龙,慕康庆.关于影响刺参 *Apostichopus japonicus* (Selenka) 生长及成活因素的探讨[J].现代渔业信息,2003,18(5):24-26.
Chang Zhongyue, Yi Jilong, Mu Kangqing. On the influence of sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) on growth and survival factors in [J]. Modern Fishery Information, 2003, 18 (5): 24-26.

[6] 张硕,陈勇,孙满昌.光强对刺参行为特性和人工礁模型集参效果的影响[J].中国水产科学,2006,13(1):20-27.
Zhang Shuo, Chen Yong, Sun Manchang. The effect of light intensity on sea cucumber ginseng set effect behavior and artificial reef models [J]. China Fisheries Science, 2006, 13 (1): 20-27.

[7] 孙慧玲.影响刺参幼参成活和生长的几个因素的研究[J].水产学报,1988,12(003):259-265.
Sun Huiling. Study on factors influencing the survival and growth of juvenile sea cucumber aquaculture Sinica [J]. Journal of Fisheries, 1988, 12 (003): 259-265.

[8] 董云伟,董双林,田相利,等.不同水温对刺参幼参生长,呼吸及体组成的影响[J].中国水产科学,2005,12(1):33-37.
Dong Yunwei, Dong Shuanglin, Tian Xiang Li, et al. effects of respiration and body composition of Different water temperature on growth of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* [J]. China Fisheries Science, 2005, 12 (1): 33-37

[9] Ji T, Dong Y, Dong S. Growth and physiological re-

- sponses in the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka: Aestivation and Temperature[J]. *Aquaculture*, 2008, 283(1): 180-187.
- [10] 张饮江, 黎臻, 谢文博, 等. 金鱼对低温, 振动胁迫应激反应的试验研究[J]. *水产科技情报*, 2012, 39(003): 116-122.
Zhang Yinjiang, Li Zhen, Xie Wenbo, et al. Experimental study on the stress response of goldfish to low temperature, vibration stress [J]. *Fisheries Science and Technology Information*, 2012, 39 (003): 116-122.
- [11] 袁秀堂, 杨红生, 陈慕雁, 等. 刺参夏眠的研究进展[J]. *海洋科学*, 2007, 31(8): 88-90.
Yuan Xiutang, Yang Hongsheng, Chen Muyan, et al. Research progress of aestivation [J]. *Marine Sciences*, 2007, 31 (8): 88-90.
- [12] 刘洪展, 徐琦, 郑风荣, 等. 镉污染对养殖刺参的毒性效应研究[J]. *海洋科学进展*, 2012, 29(A01): 30-35.
Liu Hongzhan, Xu Qi, Zheng Fengrong, et al. Study on toxic effect of cadmium pollution on cultured sea cucumber[J]. *Advances in Marine Sciences*, 2012, 29 (A01): 30-35.
- [13] Johanne, M L, William R D. Tissue-specific changes in protein synthesis associated with seasonal metabolic depression and recovery in the north temperate labrid, *Tautoglabrus adspersus*[J]. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2007, 293: R474-R481.
- [14] 臧元奇. 刺参 (*Apostichopus japonicus* Selenka) 对典型环境胁迫的生理生态学响应及其机制研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
Zang Yuanqi. (*Apostichopus japonicus* Selenka) were of typical environmental stress physiological ecology response and mechanism of [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012.
- [15] 赖廷和, 何斌源, 范航清, 等. 重金属 Cd 胁迫对红树蚬的抗氧化酶, 消化酶活性和 MDA 含量的影响[J]. *生态学报*, 2011, 31(11): 3044-3053.
Lai Tinghe, He Binyuan, Fan Hangqing, et al. Heavy metal Cd stress on the antioxidant enzymes of mangrove clam, affect the digestive enzyme activities and the content of MDA [J]. *Journal of Ecology* 2011, 31(11): 3044-3053.
- [16] Huang Z Y, Chen Y X, Zuo Z H, et al. Effects of tributyltin on lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity of digestive gland in hard clam *Meretrix meretrix*[J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science Edition)*, 2006, 45(1): 102-105.

Effects of sinusoidal waves of 178 Hz on behavior, respiration, and immune enzyme of holothurian *Apostichopus japonicus*

JIANG Wei¹, LIANG Zhen-lin², JIANG Zhao-yang², HUANG Liu-yi¹

(1. College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. College of Ocean, Shandong University, Weihai 264209, China)

Received: Jun. 12, 2015

Key words: *Apostichopus japonicus*; power wind; sound waves; oxygen consumption rate; CAT; SOD

Abstract: In accordance with characteristics of sound waves from wind power farms near China's offshore, a frequency of 178 Hz was chosen for the experiment and the sound pressure level was controlled at a range of 85 ± 5 db. Experimental Ecology was used to investigate and compare the behavior and changes in the oxygen consumption rate and antioxidant enzyme (CAT and SOD) of a group of young *Apostichopus japonicus* under the influence of sound waves and a control group. Results show that young sea cucumbers tended to lean away from the sound source, and that the oxygen consumption rate of young *A. japonicus* in the experimental group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). Although the activities of CAT were markedly higher than those in control group ($P < 0.05$), the activity of SOD in this group was almost the same as that in the control group ($P > 0.05$). These results can be used in the breeding industry of holothurian *Apostichopus japonicus* in relation to the development of wind power.

(本文编辑: 梁德海)