



夏季北黄海贝类养殖区环境因子、长牡蛎糖原和免疫指标变化的调查

高磊¹, 孔宁¹, 刘冉阳¹, 赵俊彦¹, 邢镇¹, 张子杨¹, 赵宝¹,
李庆嵩¹, 付强¹, 王文彪¹, 李磊², 王玲玲^{1*}, 宋林生¹

(1. 大连海洋大学, 辽宁省海洋动物免疫学与疫病防控重点实验室,

辽宁省海洋动物免疫学重点实验室, 辽宁 大连 116023;

2. 大连玉洋集团股份有限公司, 辽宁 大连 116499)

摘要: 为解析夏季环境胁迫和长牡蛎机体响应特征, 实验针对 2021 年北黄海夏季高温降雨期的长牡蛎养殖海区开展了 2 次调查研究和对比分析。结果显示, 7 月海区表层水温分别为 25.3 和 24.9 °C, 盐度分别为 26.41 和 27.87; 表层海水中硅藻丰度分别为 3.6×10^3 和 3×10^3 个/L, 低于往年平均水平, 甲藻多样性增加, 表层海水中细菌的总丰度分别为 2.10×10^9 和 2.77×10^{10} 个/L, 弧菌丰度分别为 3.37×10^8 和 5.40×10^8 个/L; 长牡蛎肝胰腺糖原含量分别为 40.96 和 31.58 mg/g、闭壳肌糖原含量分别为 6.63 和 8.91 mg/g; 鳃丙二醛 (MDA) 含量分别为 13.74 和 8.69 nmol/mg prot、鳃总抗氧化能力 (T-AOC) 分别为 0.46 和 0.77 U/mg prot; 海区养殖长牡蛎血淋巴细胞中 CgIL17-5 和 CgTNF-1 的 mRNA 表达量在第一次调查时相对室内暂养长牡蛎均剧烈升高; 血淋巴细胞中 CgCaspase3 的 mRNA 表达量升高但差异不显著。研究表明, 2021 年北黄海贝类养殖区在经历 6—7 月夏季高温降雨期后出现水温升高和盐度降低现象, 硅藻丰度较往年平均水平下降而甲藻多样性增加, 细菌总丰度较入夏前水平降低而弧菌丰度显著升高。与室内暂养对照组长牡蛎相比, 海区养殖长牡蛎的糖原含量下降, 并发生轻度氧化应激。研究结果有助于进一步理解夏季养殖环境的变化规律和长牡蛎机体响应特征, 为预防夏季大规模死亡发生提供理论依据和参考。

关键词: 长牡蛎; 高温; 降雨; 糖原; 免疫; 北黄海

中图分类号: S 944.4¹

文献标志码: A

长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 是我国重要的水产养殖贝类, 2018 年全国养殖产量达 124.11 万 t, 占当年全国牡蛎总产量的 24.15%^[1], 已成为我国北方重要的海水养殖品种, 也是世界范围内养殖最广泛的水产动物之一。然而, 近十年来养殖长牡蛎的夏季大规模死亡现象时有发生。例如, 2016 年大连养殖长牡蛎夏季死亡率为 50% 以上^[2],

2019 年山东乳山养殖长牡蛎夏季死亡率达 50%~90%^[3]。长牡蛎夏季大规模死亡的有效防控已成为保障其养殖产业绿色高质量发展的重要方向。

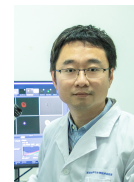
目前研究认为, 养殖长牡蛎夏季大规模死亡是高温、降雨、病原微生物、饵料藻丰度和繁殖行为等多种因素共同作用的结果^[4]。例如, 高温被认为是最重要的非生物胁迫因素之一, 研究发

收稿日期: 2022-03-05 修回日期: 2022-06-19

资助项目: 国家重点研发计划 (2018YFD0900606); 国家自然科学基金国际 (地区) 合作与交流项目 (41961124009); 农业农村部: 国家现代农业产业技术体系 (CARS-49); 大连市科技创新基金 (2021JJ13SN73); 辽宁省应用基础研究计划 (2022JH2/101300140)

第一作者: 高磊 (照片), 从事生态免疫学研究, E-mail: gaolei@dlou.edu.cn

通信作者: 王玲玲, 从事贝类免疫学研究, E-mail: wanglingling@dlou.edu.cn



现, 长牡蛎夏季大规模死亡常发生在温度较高的法国南部, 而在温度较低的法国北部则较少发生^[5]。19~20 °C 是养殖长牡蛎夏季大规模死亡风险发生的临界温度, 当夏季温度超过 19 °C 时, 通过与疱疹病毒等病原胁迫的复合作用, 导致大规模死亡的风险迅速上升^[6]。夏季降水也是养殖长牡蛎面临的另一个重要非生物胁迫, 其造成的盐度降低、径流输入增加和水层交换易影响长牡蛎的环境渗透压和食物组成等^[7-8]。监测长牡蛎养殖海区关键环境因子和机体健康相关指标的变化规律, 解析环境胁迫对长牡蛎糖原和免疫等指标的影响, 将有助于及时了解大规模死亡的发生风险并进行防控^[9]。

2021 年 6 月下旬至 7 月下旬, 大连北黄海长牡蛎养殖海区出现持续降雨和高温天气, 其中, 降雨主要集中在 6 月 20 日—7 月 20 日, 降水量共计 193 mm, 较常年同期增加 67 mm; 高温天气主要集中在 7 月中下旬, 其中 7 月下旬平均气温 26.3 °C, 较常年同期升高 1.8 °C (数据源自大连市气象局)。进入 7 月下旬后, 大连庄河市王家岛海域养殖长牡蛎开始出现区域性死亡, 死亡率达 10%~30%。本实验对 7 月下旬大连庄河市王家岛海域的环境因子变化进行了调研, 包括水质因子、饵料藻和病原微生物等, 检测了长牡蛎糖原和免疫等指标的变化规律, 分析了环境胁迫可能对长牡蛎健康状态的影响, 为夏季大规模死亡防控提供理论依据和参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究分别于 2021 年 7 月 24 日和 7 月 29 日, 在辽宁省大连庄河市王家岛镇大连玉洋集团股份有限公司长牡蛎浮筏养殖海区, 进行了养殖调查和样品采集, 包括原位水质监测、海水样品采集、微生物样品采集、长牡蛎组织及活体长牡蛎样品采集等。根据天气情况和养殖调研, 7 月 24 日进行第 1 次调查采样 (1T) 时长牡蛎养殖受高温和降雨的复合环境胁迫作用明显, 7 月 29 日进行第 2 次调查采样 (2T) 时养殖过程主要受高温胁迫影响。具体样品采集过程: 每次调查采样时随机选取 3 处长牡蛎养殖海域, 采集 3 L 未处理表层海水, 在常温条件下于 4 h 内带回实验室用于浮游微藻计数分析; 采集 3 L 表层海水加入 0.1% 碳酸镁悬浊液后立即过滤至 0.7 μm GF/F 滤膜, 锡纸包裹滤

膜后于干冰环境保存, 于 4 h 内带回实验室用于叶绿素 (Chl.a) 含量分析; 采集 3 L 表层海水经 0.22 μm 滤膜过滤后, 于 0~4 °C 下 4 h 内带回实验室用于水质分析, 滤膜于干冰环境保存, 于 4 h 内带回实验室用于细菌丰度分析。每次调查随机采集 18 只 2 龄长牡蛎, 平均体重 (118.09±32.48) g, 其中 9 只长牡蛎于 0~4 °C 条件下于 4 h 内带回实验室用于体内微生物分析和肠道内容物分析, 另外 9 只长牡蛎冲洗干净外壳后, 取鳃、血淋巴、肝胰腺和闭壳肌的组织样品直接冻存或使用 TRIzol 试剂保存, 于 4 h 内干冰环境中带回实验室用于长牡蛎相关指标分析, 其中以 7 月 24 日和 7 月 29 日采集的长牡蛎组织样品分别为 1T 和 2T 处理组, 以 5—7 月实验室暂养的相同来源的长牡蛎个体为对照组 (C)。本研究获得了大连海洋大学实验动物管理和使用伦理委员会批准, 实验过程中操作人员严格遵守大连海洋大学伦理规范, 并按照大连海洋大学伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 水质分析

利用 YSI 多参数水质测定仪 (美国) 对表层海水温度、溶解氧 (DO) 含量、pH 和盐度 (S) 进行原位监测。依据 GB 17378.4—2007 《海洋监测规范》^[10], 分别利用次溴酸盐氧化法、萘乙二胺分光光度法、锌-镉还原法、磷钼蓝分光光度法和硅钼蓝法, 对表层海水样品的铵盐 (NH₄⁺)、亚硝酸盐 (NO₂⁻)、硝酸盐 (NO₃⁻)、磷酸盐 (PO₄⁻) 和硅酸盐 (SiO₃⁻) 浓度进行分析。

1.3 浮游微藻分析与鉴定

将 GF/F 滤膜转移至含有 10 mL 90% 丙酮溶液的离心管中, 在 4 °C 下静置 24 h 后使用分光光度法分析 Chl.a 浓度^[11]。取 1 L 未过滤的表层海水样品加入 10 mL Lugo 氏溶液固定浓缩后用于浮游微藻鉴定和计数^[12]。

1.4 细菌丰度分析

分别利用 EZNA™ Water DNA Kit 和 EZNA™ Soil DNA Kit (OMEGA Bio-Tek, 美国) 提取表层海水样品和长牡蛎鳃组织样品 DNA。使用 Nano-Drop 2000 分光光度计 (丹麦) 检测提取的 DNA 质量合格后用于荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析。建立细菌总数和弧菌 (*Vibrio*) 的绝对定量 PCR 标准曲线, 构建待测基因的标准质粒, 测序验证后测定标准质粒浓度, 计算拷贝数后梯度稀释标准质

粒, 作为模板进行 qRT-PCR 检测。对于牡蛎疱疹病毒 (OSHV-1) 拷贝数检测, 定义 $C_t < 30$ 为阳性。在对表层海水样品的细菌丰度进行分析时, 以 7 月 24 日和 7 月 29 日采集的表层海水样品分别为

1T 和 2T 处理组, 以 2021 年 6 月 21 日 (夏季环境胁迫发生前) 采集的相同海域的表层海水样品作为对照组 (C)。细菌丰度分析所用引物见表 1, 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 引物信息

Tab. 1 Primer information

引物名称 primers	引物序列 primers sequence	用途 purpose
CgEF-F	AGTCACCAAGGCTGCACAGAAAG	qRT-PCR
CgEF-R	TCCGACGTATTTCTTTGCGATGT	qRT-PCR
CgTNF-1-F	CTTCTCGTCTGCGGCTCTTT	qRT-PCR
CgTNF-1-R	CAGGGCTGCGGCTTTCC	qRT-PCR
CgTNF-2-F	CCACTACGCCCACTAAGAAACTG	qRT-PCR
CgTNF-2-R	AAGCGACCATTGCGAAACTCCAT	qRT-PCR
CgIL17-5-F	TCTGGCTGACTCTCGTCTTG	qRT-PCR
CgIL17-5-R	GACCCGTGTCGTGTCCTACC	qRT-PCR
CgCaspase3-F	TGGGCTGAACGAGCGGAATGGC	qRT-PCR
CgCaspase3-R	TTCCGCGGCTTCTGTAGTGTA	qRT-PCR
16S-341F	CCTACGGGAGGCAGCAG	总菌丰度
16S-534R	ATTACGCGGCTGCTGG	总菌丰度
Vsp-F	GGCGTAAAGCGCATGCAGGT	弧菌丰度
Vsp-R	GAAATTCTACCCCTCTACAG	弧菌丰度
OSHV-F	ATTGATGATGTGGATAATCTGTG	疱疹病毒丰度
OSHV-R	GGTAAATACCATTGGTCTTGTCC	疱疹病毒丰度

1.5 组织糖原和葡萄糖含量分析

取长牡蛎肝胰腺和闭壳肌组织各 0.1 g 置于磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 中, 冰水浴条件下用匀浆机制成组织匀浆 (10%, 质量体积分数), 在 4 °C、2 500 r/min 下离心 10 min, 取上清液进行检测。使用生化检测试剂盒 (编号: BC0345, 北京索莱宝科技有限公司) 测定糖原含量, 使用生化检测试剂盒 (编号: F006-1-1, 南京建成生物工程研究所) 测定葡萄糖含量。

1.6 氧化应激相关指标分析

取长牡蛎鳃组织 0.1 g 置于 PBS 中, 冰水浴条件下用匀浆机制成组织匀浆 (10%, 质量体积分数), 在 4 °C、2 500 r/min 下离心 10 min, 取上清液检测。使用南京建成生物工程研究所生化检测试剂盒 (试剂盒编号: A003-1-2、A015-1-2、A001-3-2、A007-1-1、A006-2-1、A084-1-1) 分别测定丙二醛 (MDA) 含量, 总抗氧化能力 (T-AOC)、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、过氧化物酶 (POD) 活性和还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量。

1.7 免疫相关指标分析

采用 TRIzol 法提取长牡蛎血淋巴细胞总 RNA,

利用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 利用 NanoDrop 2000 检测 RNA 浓度和纯度, 反转 RNA 合成 cDNA。以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 分析 (表 1), 以延伸因子基因 (EF) 作为内参基因, 利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 算法分析免疫相关基因的 mRNA 表达量^[13]。

1.8 肠道内容物分析

解剖采集的活体长牡蛎样品, 用无菌海水将软体部冲洗干净, 去除外套膜、鳃和闭壳肌组织, 保留肝胰腺等主要组织, 延纵向进行解剖, 观察长牡蛎的肠道食物和粪便等残留情况。实验以正常摄食和饥饿 2 d 的长牡蛎个体作为对照进行分析。

1.9 数据分析

本研究中实验样品均设置 3 个平行。利用 SPSS 26 软件进行单因素方差分析和多重比较, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 水质因子变化

大连庄河市王家岛长牡蛎养殖海域 7 月下旬水质因子分析结果显示, 2 次调查的海区表层水温分别为 25.3 和 24.9 °C, 养殖笼下缘 (约水下 5

m)的水温分别为 24.1 和 23.1 °C, 较表层低 1~2 °C。第 2 次调查的 DO 为 5.83 mg/L, 低于第 1 次调查的 7.24 mg/L。两次调查的 S 分别为 26.41 和 27.87, 第 2 次调查的 S 较第 1 次调查水平有所升高。表层海水 pH 相对稳定, 两次调查的检测结果分别为 7.69 和 7.75 (表 2)。

2.2 Chl.a 浓度、浮游微藻与肠道内容物变化

表层海水 Chl.a 浓度在两次调查期间出现显著差异 ($P<0.05$), 由第 1 次调查的 1.448 $\mu\text{g/L}$ 升至第 2 次调查的 5.505 $\mu\text{g/L}$, 增加至 3.8 倍 (表 3)。

表 2 表层海水水质因子变化

水质因子 water quality	1T	2T
T/°C (表层 surface)	25.3	24.9
T/°C (5 m)	24.1	23.1
DO/(mg/L)	7.24	5.83
S	26.41	27.87
pH	7.69	7.75
NH ₄ -N/(mg/L)	0.088±0.001	0.094±0.004
NO ₂ -N/(mg/L)	0.012±0.001	0.007±0.001
NO ₃ -N/(mg/L)	0.195±0.023	0.079±0.001
PO ₄ -P/(mg/L)	0.019±0.003	0.011±0.001
SiO ₄ -Si/(mg/L)	0.977±0.016	0.629±0.016

表 3 表层海水 Chl.a 浓度和浮游微藻丰度变化

浮游微藻参数 planktonic microalgae	1T	2T
Chl.a/($\mu\text{g/L}$)	1.448±0.142	5.505±0.455
硅藻/(个/L) Bacillariophyta	3.6×10 ³	3.0×10 ³
甲藻/(个/L) Pyrrophyta	1.3×10 ⁴	4.0×10 ³

通过对饵料藻 (主要为硅藻和甲藻) 的分析发现, 第 1 次调查时硅藻丰度约为 3.6×10³ 个/L, 优势种为舟形藻 (*Navicula* sp.); 甲藻丰度约为 1.3×10⁴ 个/L, 优势种为叉状角藻 (*Ceratium* sp.) 和夜光藻 (*Noctiluca* sp.)。第 2 次调查时硅藻丰度约为 3.0×10³ 个/L, 优势种为大型硅藻, 如圆筛藻 (*Coscinodiscus* sp.) 和角毛藻 (*Chaetoceros* sp.) 等; 甲藻丰度约为 4.0×10³ 个/L, 优势种多为小型甲藻 (图版 I)。长牡蛎肠道内容物分析结果显示, 饥饿 2 d 的对照组长牡蛎肠道内壁光滑, 未见食物和粪便, 2 次调查的长牡蛎样品肠道内壁呈淡绿色, 且可见粪便 (图版 II, 图内红圈)。

2.3 病原微生物变化

通过表层养殖水体浮游细菌丰度分析发现, 第 1 次调查时水体细菌总丰度为 2.10×10⁹ 个/L, 显著低于入夏前的对照组水平 (3.62×10¹⁰ 个/L)。

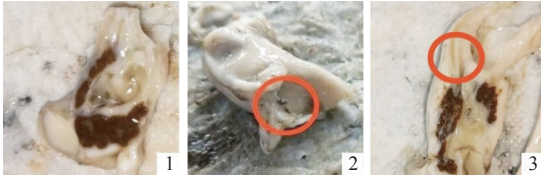


图版 I 表层海水中的饵料藻与甲藻鉴定

1. 叉状甲藻, 2. 夜光藻, 3. 小环藻, 4. 圆筛藻, 5. 叉状甲藻, 6. 原甲藻。

Plate I Identification of bait algae and dinoflagellates in surface seawater

1. *Ceratium*, 2. *Noctiluca*, 3. *Cyclotella*, 4. *Coscinodiscus*, 5. *Ceratium*, 6. *Prorocentrum*.



图版 II 长牡蛎肠道内容物的解剖观察

1. 饥饿 2 d 对照组长牡蛎, 2. 第 1 次调查采集长牡蛎, 3. 第 2 次调查采集长牡蛎。

Plate II View of intestinal contents after dissection

1. the oyster in the control group with two-day starvation, 2. the oyster from the 1st survey, 3. the oyster from the 2nd survey.

($P < 0.05$), 第 2 次调查时水体细菌总丰度恢复至接近对照组水平 (2.77×10^{10} 个/L) (图 1-a)。与水体细

菌总丰度变化不同, 在两次调查中水体弧菌丰度分别为 3.37×10^8 和 5.40×10^8 个/L, 均显著高于对照组水平 ($P < 0.05$) (图 1-b)。对长牡蛎鳃组织中细菌丰度进行分析发现, 第 1 次调查时鳃组织细菌总丰度为 6.73×10^9 个/g, 显著高于室内暂养的对照组长牡蛎水平 (3.53×10^8 个/g) ($P < 0.05$), 第 2 次调查时鳃组织细菌总丰度恢复至接近对照组水平 (3.62×10^8 个/g) (图 1-c)。在两次调查中鳃组织弧菌丰度均与对照组水平差异不显著 (图 1-d)。此外, 分析了两次调查的水体和鳃组织样品中是否含有 OSHV-1, 结果均为阴性。

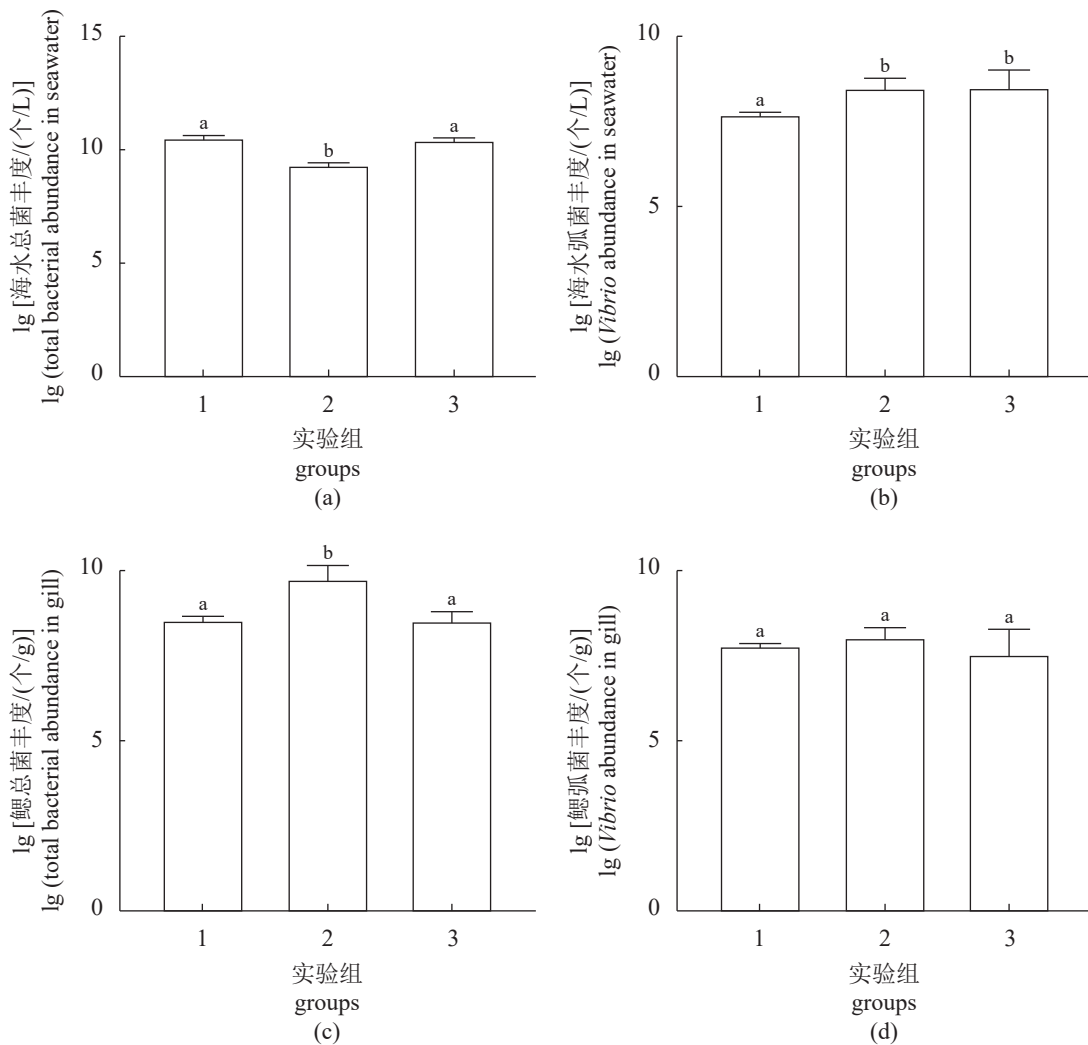


图 1 表层海水和长牡蛎鳃中细菌总丰度和弧菌丰度的变化

(a) 表层海水中细菌总丰度, (b) 表层海水中弧菌丰度, (c) 长牡蛎鳃组织中细菌总丰度, (d) 长牡蛎鳃组织中弧菌丰度; 1. 对照处理 C, 2. 处理组 1T, 3. 处理组 2T, 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

Fig. 1 The abundance variation of total bacteria and *Vibrio* in the surface seawater and the gill of *C. gigas*

(a) total bacterial abundance in the surface seawater, (b) *Vibrio* abundance in the surface seawater, (c) total bacterial abundance in the gill of *C. gigas*, (d) *Vibrio* abundance in the gill of *C. gigas*; 1. control group, 2. 1T group, 3. 2T group, different letters indicate significant difference ($P < 0.05$), the same below.

2.4 组织糖原和葡萄糖含量变化

长牡蛎肝胰腺和闭壳肌组织糖原含量在两次调查期间与室内暂养的对照组长牡蛎相比呈下降趋势: 肝胰腺糖原含量在两次调查时分别为 40.96 和 31.58 mg/g, 第 2 次调查时的肝胰腺糖原含量显著低于对照组 ($P<0.05$) (图 2-a); 闭壳肌糖原含量在 2 次调查时分别为 6.63 和 8.91 mg/g, 均显著低于对照组 ($P<0.05$) (图 2-b)。肝胰腺葡萄糖含量在第 1 次调查时为 26.64 nmol/g, 显著低于对照组 ($P<0.05$), 在第 2 次调查时恢复至对照组水平 (图 2-c); 闭壳肌葡萄糖含量在两次调查中与对照组相比无显著变化 (图 2-d)。

2.5 氧化应激相关指标的变化

在两次调查过程中, MDA 含量分别为 13.74 和 8.69 nmol/mg prot, 与室内暂养的对照组长牡蛎和第 2 次调查相比, 第 1 次调查的 MDA 含量偏

高但差异不显著 (图 3-a)。T-AOC 含量分别为 0.46 和 0.77 U/mg prot, 较对照组显著降低 ($P<0.05$), 且第 2 次调查的 T-AOC 较第 1 次调查显著升高 ($P<0.05$) (图 3-b)。SOD 活性分别为 165.11 和 159.95 U/mg prot, 与对照组相比差异不显著 (图 3-c)。CAT 活性分别为 1.59 和 0.79 U/mg prot, 与对照组和第 1 次调查相比, 第 2 次调查的 CAT 活性显著降低 ($P<0.05$) (图 3-d)。GSH 含量分别为 110.89 和 74.51 $\mu\text{mol/g prot}$, 与对照组相比差异不显著 (图 3-e)。POD 活性分别为 26.21 和 14.57 U/mg prot, 第 1 次调查的 POD 活性较对照组和第 2 次调查数据显著升高 ($P<0.05$) (图 3-f)。

2.6 免疫相关指标的变化

在 2 次调查过程中, CgIL17-5 的 mRNA 相对表达量分别为 21.97 和 10.57, 均显著高于室内暂养的对照组长牡蛎 ($P<0.05$), 且第 2 次调查的

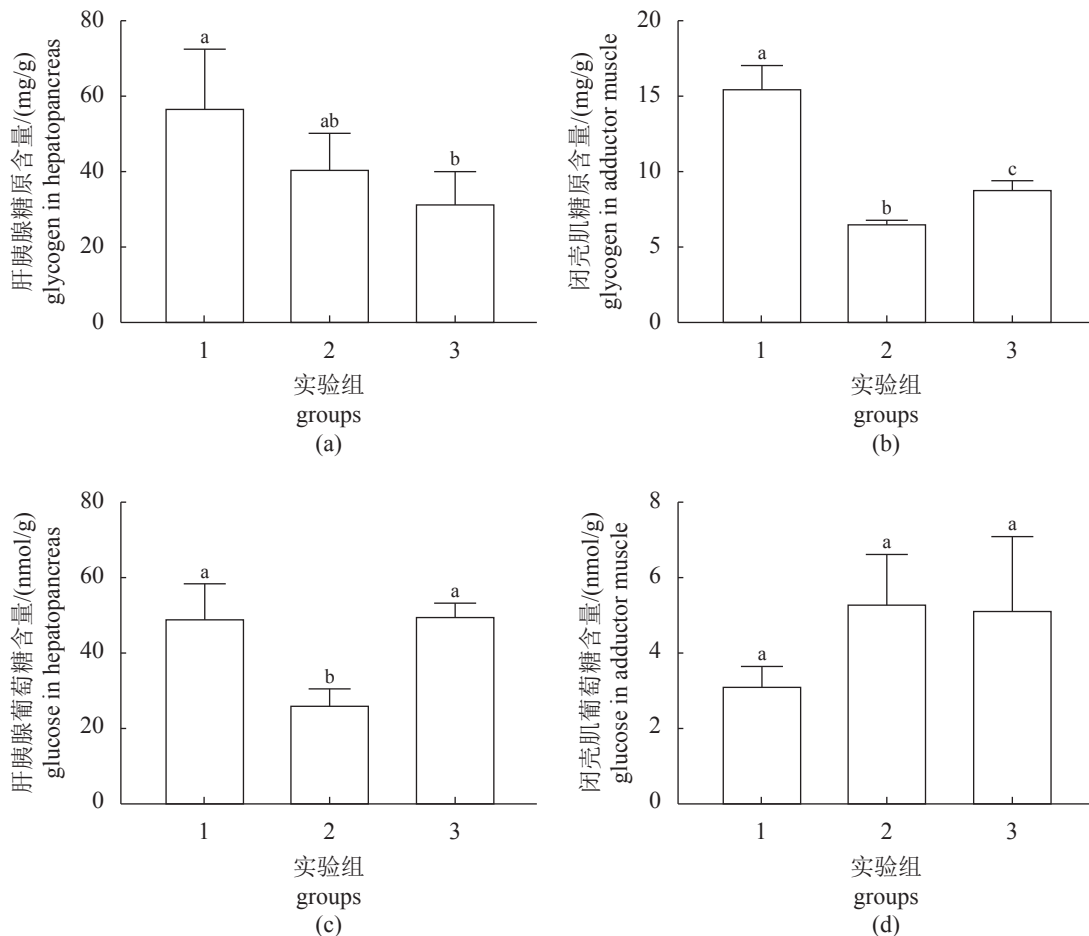


图 2 长牡蛎闭壳肌和肝胰腺中糖原和葡萄糖含量变化

(a) 肝胰腺糖原含量, (b) 闭壳肌糖原含量, (c) 肝胰腺葡萄糖含量, (d) 闭壳肌葡萄糖含量。

Fig. 2 The content variation of glycogen and glucose in the hepatopancreas and adductor muscle of *C. gigas*

(a) glycogen in hepatopancreas, (b) glycogen in adductor muscle, (c) glucose in hepatopancreas, (d) glucose in adductor muscle.

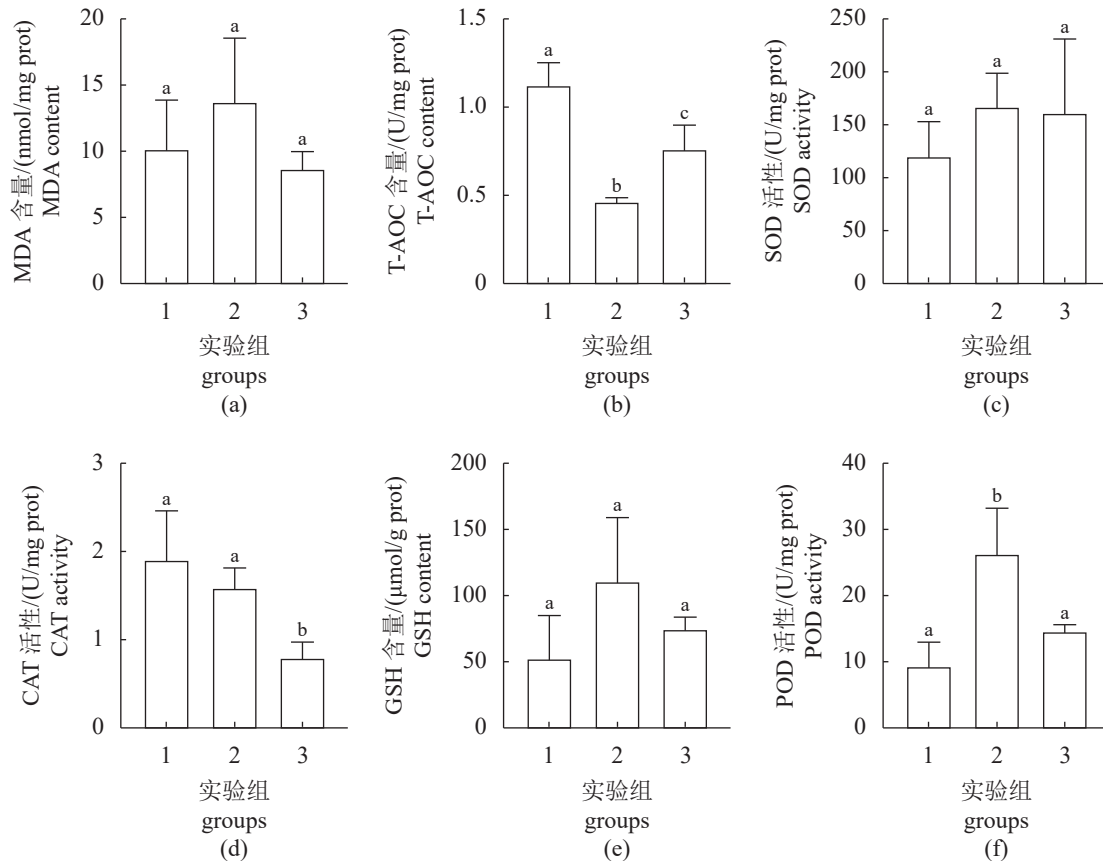


图 3 长牡蛎鳃中氧化应激相关指标的变化

(a) MDA 含量, (b) T-AOC 含量, (c) SOD 活性, (d) CAT 活性, (e) GSH 含量, (f) POD 活性。

Fig. 3 The variation of the parameters related to oxidative stress in the gill of *C. gigas*

(a) content of MDA, (b) content of T-AOC, (c) SOD activity, (d) CAT activity, (e) content of GSH, (f) POD activity.

CgIL17-5 的 mRNA 表达量较第 1 次调查显著下降 ($P < 0.05$) (图 4-a)。CgCaspase3 的 mRNA 表达量在两次调查中呈升高趋势, 但与对照组相比差异不显著 (图 4-b)。CgTNF-1 的 mRNA 表达量在第 1 次调查时为 7.06, 显著高于对照组 ($P < 0.05$), 在第 2 次调查时为 0.14, 较第 1 次调查显著降低 ($P < 0.05$) (图 4-c)。CgTNF-2 的 mRNA 表达量在第 1 次调查时为 0.92, 与对照组相比差异不显著, 在第 2 次调查时为 0.34, 较第 1 次调查显著降低 ($P < 0.05$) (图 4-d)。

3 讨论

环境胁迫是导致北黄海长牡蛎养殖夏季大规模死亡发生的重要原因。本实验首先分析了夏季北黄海贝类养殖区环境因子的变化水平, 包括温度、DO、盐度和营养盐等水质因子。在温度方面, 通过对大连庄河市王家岛长牡蛎养殖海域的两次调查分析发现, 在夏季高温气象特征发生期间,

表层海水温度较正常水平偏高, 已形成高温胁迫, 易造成养殖长牡蛎的大规模死亡^[14]。在 DO 方面, 伴随表层海水温度升高, 第 2 次调查的表层海水 DO 明显低于第 1 次调查和正常水平, 这在夏季高温期较为常见^[14], 但还未形成低氧胁迫。在盐度方面, 受夏季持续降雨影响, 通过直接作用和间接径流注入的方式使海水盐度明显低于正常水平^[15], 虽然还未形成长牡蛎渗透压胁迫, 但可能对水体微生物种群结构造成影响。在营养盐方面, 高温和降雨等夏季环境胁迫对表层海水营养盐含量的影响不明显, 营养盐水平符合《海水水质标准》(GB 3097—1997) 规定的第二类水质标准^[16], 未出现富营养化或贫营养化现象, 但与张广帅等^[17]于 2018 年的调查数据相比偏高, 可能是由不同季节的养殖活动和藻类影响造成的^[18]。因此, 在 2021 年夏季典型高温和降雨集中发生时期, 贝类养殖区主要表现为温度胁迫和盐度下降, 未出现 DO 和营养盐等其他环境胁迫。

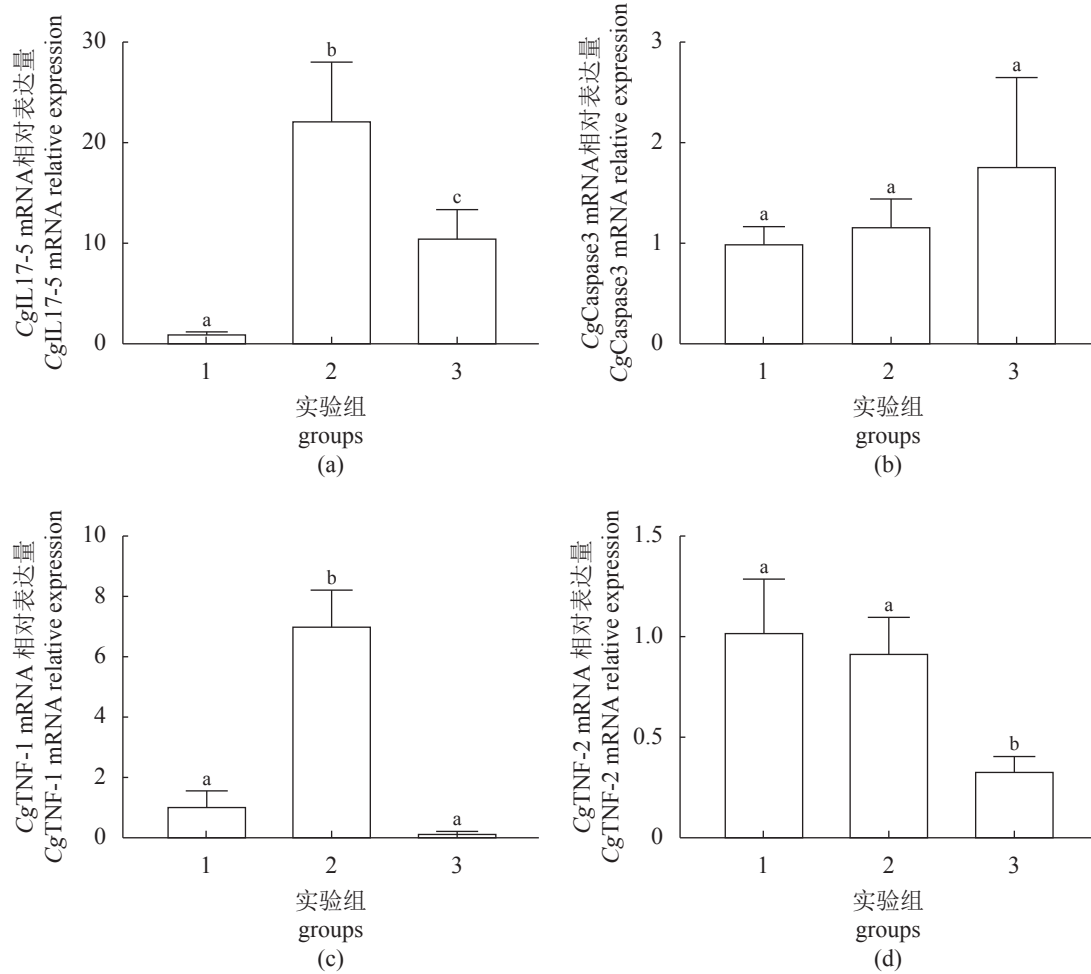


图 4 长牡蛎血淋巴细胞中免疫应答相关基因 mRNA 表达变化

(a) CgIL17-5 mRNA 相对表达量, (b) CgCaspase3 mRNA 相对表达量, (c) CgTNF-1 mRNA 相对表达量, (d) CgTNF-2 mRNA 相对表达量。

Fig. 4 The variation of the mRNA expression levels of immune genes in the haemocytes of *C. gigas*

(a) CgIL17-5 mRNA relative expression, (b) CgCaspase3 mRNA relative expression, (c) CgTNF-1 mRNA relative expression, (d) CgTNF-2 mRNA relative expression.

养殖水体中的浮游微藻是长牡蛎主要的食物来源之一, 在本研究的两次调查中, Chl.*a* 浓度呈上升趋势, 可能是受降雨后不同水层营养盐交换加快和高温期充足光照的影响。通过分析肠道内容物, 未发现长牡蛎摄食状态异常, 肠道内容物较少可能是由于在运输过程中部分食物被消化以及粪便排出造成的。然而, 两次调查中的浮游硅藻丰度远低于 2005—2015 年北黄海硅藻丰度的平均水平^[19], 提示养殖海区硅藻等饵料藻严重不足, 局部养殖密度过大和养殖模式单一可能是导致长牡蛎养殖海区饵料藻不足的主要原因^[20]。虽然在两次调查中硅藻/甲藻丰度比呈上升趋势, 但仍观察到较多的甲藻包囊, 且第 2 次调查时发现甲藻种群多样性明显增加, 提示夏季环境胁迫期间存在甲藻暴发风险。

因环境变化导致的病原菌等细菌丰度和种群结构改变, 是造成养殖长牡蛎夏季大规模死亡发生的重要生物胁迫因素。在水产养殖系统中, 浮游细菌种群结构易受环境影响而发生变化, 水体细菌丰度变化与养殖动物的疾病发生存在密切联系。在本研究中, 夏季高温和降雨等环境变化对养殖水体中的细菌丰度造成了明显影响, 导致细菌总丰度显著降低以及弧菌丰度显著升高, 其中细菌总丰度在第 2 次调查时恢复到对照组水平, 而弧菌丰度在两次调查中均高于对照组水平。自然海区弧菌丰度在夏季高温期易出现上升^[21-22], 本研究结果提示, 水环境存在细菌丰度和种群结构的变化以及潜在病原菌——弧菌的暴发风险, 在夏季应重点关注弧菌丰度及弧菌/细菌总丰度比的变化情况。组织共生微生物广泛参与宿主的生

理、代谢、营养吸收和免疫防御等功能, 共生微生物的种群结构稳态是宿主正常行使生理功能的保障, 其异常变化常导致宿主代谢紊乱和免疫应激等问题^[23-24]。在本研究中, 长牡蛎鳃组织细菌总丰度在第1次调查时上升, 在第2次调查时恢复至对照组水平, 而鳃组织弧菌丰度未发生明显变化。研究结果提示, 夏季环境变化导致长牡蛎共生微生物丰度和组成结构发生改变, 但仍处于可控状态, 未造成共生微生物紊乱^[25]。

能量储存和代谢水平与长牡蛎的环境胁迫抗性密切相关^[26], 能量储存不足等因素易造成长牡蛎抗胁迫能力减弱, 导致损伤或死亡。糖原是动物能量储存的主要形式之一, 常在肝脏和肌肉中发现, 通过分解为葡萄糖来供给能量。在牡蛎中糖原含量随季节变化, 在繁殖期会因性腺发育和产卵行为而加速消耗^[27]。在本研究中, 长牡蛎的肝胰腺和闭壳肌糖原含量均出现下降, 一方面可能受高温和降雨等夏季环境胁迫的影响^[28], 另一方面, 繁殖季节能量需求增加也是导致糖原含量下降的重要原因。葡萄糖是组织糖原的分解产物, 能够直接用于糖酵解并为机体提供 ATP^[29]。在本研究中, 除第1次调查时肝胰腺葡萄糖含量出现下降外, 其他检测结果未发现组织葡萄糖含量的明显变化, 这可能来自于组织能量供给过程中的稳态需求。研究结果提示, 在夏季出现环境胁迫和繁殖行为时, 应特别关注长牡蛎糖原等能量存储水平的变化。

环境和病原胁迫常引发生物体的抗氧化反应, 产生氧化应激状态, 氧化应激相关指标能够有效反映机体的应激水平和抗氧化能力。MDA 是过氧化反应终产物, 其含量可反映机体的活性氧自由基和脂质的过氧化水平, 从而间接反映细胞的受损程度^[30]。在本研究中, MDA 含量在第1次调查时出现升高, 在第2次调查时恢复至对照组水平, 说明在第1次调查时机体受环境胁迫影响出现轻度氧化应激反应, 这与已有报道一致^[31]。T-AOC 能够反映机体抗氧化酶系统和非酶促系统对外来刺激的代偿能力以及机体自由基的代谢状态^[32]。在本研究中, T-AOC 的变化规律与 MDA 含量变化规律相反, 即在第1次调查时降低而在第2次调查时升高, 其变化规律说明机体在第1次调查时抗氧化酶和非酶促系统代谢水平较弱, 而在第2次调查时增强。4种抗氧化酶呈现特异性变化规律, 可能与不同抗氧化酶的功能特性有关。研究

结果提示, 在本研究的夏季高温和降雨等环境胁迫发生时, 长牡蛎组织出现了明显的抗氧化反应, 并形成了轻度氧化应激。

免疫应答和细胞凋亡是长牡蛎响应病原和环境胁迫的主要手段之一。CgIL17-5、CgTNF-1 和 CgTNF-2 是长牡蛎免疫过程的重要细胞因子, 直接参与机体免疫应答和调控^[33]。在本研究中, CgIL17-5 和 CgTNF-1 的 mRNA 表达量均在第1次调查时剧烈升高, 在第2次调查时回落, 说明在第1次调查时由于高温和降雨复合胁迫的影响导致长牡蛎出现较强的免疫应激, 而随着环境胁迫的缓和, 在第2次调查时免疫应激状态有所减弱。CgTNF-2 的 mRNA 表达量在第2次调查时下降, 具体原因还需结合其功能特异性进一步研究。CgCaspase3 是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶之一, 是长牡蛎凋亡过程的重要功能分子。在本研究中, CgCaspase3 的 mRNA 表达量升高, 但与对照组相比差异不显著, 说明在夏季环境胁迫发生时, 长牡蛎机体已启动凋亡程序, 但还未发生严重的凋亡反应^[34]。

综上, 通过分析夏季高温和降雨等典型天气发生时期的长牡蛎养殖海区关键环境因子和机体健康相关指标的变化规律, 初步探明了夏季北黄海长牡蛎的养殖特征: 2021年北黄海贝类养殖区在经历6—7月夏季高温降雨期后出现水温升高和盐度降低现象, 硅藻丰度较往年平均水平下降而甲藻多样性增加, 细菌总丰度较入夏前水平降低而弧菌丰度显著升高。与室内暂养对照组长牡蛎相比, 海区养殖长牡蛎的糖原含量下降, 并发生轻度氧化应激。研究结果有助于进一步理解夏季养殖环境的变化规律和长牡蛎机体响应特征, 为预防夏季大规模死亡发生提供理论依据和参考。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 国家贝类产业技术体系. 中国牡蛎产业发展报告[J]. 中国水产, 2021(6): 20-31.
China Shellfish Research System. China oyster industry development report[J]. China Fisheries, 2021(6): 20-31 (in Chinese).
- [2] 惠农网. 大连牡蛎今年死亡率近 50%[EB/OL]. (2016-11-29). <https://news.cnhnb.com/rdxz/detail/372526/>.
Huinong Net. Nearly 50% of oysters have died in Dalian

- this year[EB/OL]. (2016-11-29). <https://news.cnhnb.com/rdzx/detail/372526/> (in Chinese).
- [3] 魏钰恒, 潘英, 刘圣, 等. 乳山长牡蛎(*Crassostrea gigas*)的抗性基因表达和生存环境的季节差异[J]. 海洋通报, 2020, 39(5): 601-608.
Wei Y H, Pan Y, Liu S, *et al.* Seasonal differences in resistance gene expression and environment of *Crassostrea gigas* at Rushan[J]. Marine Science Bulletin, 2020, 39(5): 601-608 (in Chinese).
- [4] Samain J F, Dégremont L, Soletchnik P, *et al.* Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes[J]. *Aquaculture*, 2007, 268(1-4): 227-243.
- [5] EFSA Panel on Animal Health and welfare (AHAW). Scientific opinion on the increased mortality events in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*[J]. *EFSA Journal*, 2010, 8(11): 1894.
- [6] Garnier M, Labreuche Y, Garcia C, *et al.* Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Microbial Ecology*, 2007, 53(2): 187-196.
- [7] 霍恩泽, 张雯雯, 李加琦, 等. 盐度骤降对近江牡蛎和长牡蛎能量收支的影响[J]. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 132-138.
Huo E Z, Zhang W W, Li J Q, *et al.* Effects of acute salinity changes on energy budgets of oysters *Crassostrea ariakensis* and *Crassostrea gigas*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(2): 132-138 (in Chinese).
- [8] 许岚, 李琪, 孔令锋, 等. 温度和盐度对壳黑长牡蛎幼虫生长和存活的影响[J]. 中国海洋大学学报, 2017, 47(8): 44-50.
Xu L, Li Q, Kong L F, *et al.* Effects of temperature and salinity on growth and survival of larvae of black-shell Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)[J]. Periodical of Ocean University of China, 2017, 47(8): 44-50 (in Chinese).
- [9] 宋林生. 海水养殖贝类病害预警预报技术及其应用[J]. 大连海洋大学学报, 2020, 35(1): 1-9.
Song L S. An early warning system for diseases during mollusc mariculture: exploration and utilization[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2020, 35(1): 1-9 (in Chinese).
- [10] 国家海洋环境监测中心. 海洋监测规范 第4部分: 海水分析: GB 17378.4—2007 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
National Marine Environment Monitoring Center. The specification for marine monitoring—Part 4: seawater analysis: GB 17378.4-2007 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2008 (in Chinese).
- [11] Lorenzen C J. Determination of chlorophyll and phycobilipigments: spectrophotometric equations[J]. *Limnology and Oceanography*, 1967, 12(2): 343-346.
- [12] Liang Y, Zhang G T, Wan A Y, *et al.* Nutrient-limitation induced diatom-dinoflagellate shift of spring phytoplankton community in an offshore shellfish farming area[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2019, 141: 1-8.
- [13] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [14] 廉伟, 温海深, 毛玉泽, 等. 长牡蛎夏季死亡与养殖环境及自身体质关系的初步研究[J]. 渔业科学进展, 2010, 31(4): 92-100.
Lian W, Wen H S, Mao Y Z, *et al.* Study on the relationship between pacific oyster *Crassostrea gigas* summer mortality with culture environment and organism condition[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(4): 92-100 (in Chinese).
- [15] 石强. 北黄海夏季温盐年际变化时空模态与气候响应[J]. 应用海洋学学报, 2016, 35(4): 469-483.
Shi Q. Climate response and spatio-temporal modes on the interannual summer changes of temperature-salinity in North Yellow Sea[J]. *Journal of Applied Oceanography*, 2016, 35(4): 469-483 (in Chinese).
- [16] 国家海洋局第三海洋研究所. 海水水质标准: GB 3097—1997[S]. 北京: 环境科学出版社, 2004.
Third Institute of Oceanography-State Oceanic Administration. Marine water quality standard: GB 3097-1997[S]. Beijing: China Environmental Press, 2004 (in Chinese).
- [17] 张广帅, 闫吉顺, 张全军, 等. 基于主成分分析法近岸海水环境质量与空间异质性研究——以庄河港近岸海域为例[J]. 海洋环境科学, 2020, 39(2): 244-252.
Zhang G S, Yan J S, Zhang Q J, *et al.* Study on the seawater quality and its spatial heterogeneity based on principle component analysis: a case study nearshore of Zhuanghe port[J]. *Marine Environmental Science*, 2020,

- 39(2): 244-252 (in Chinese).
- [18] 劳齐斌, 刘国强, 高劲松, 等. 钦州湾养殖区营养盐分布特征及富营养化状况研究[J]. *海洋环境科学*, 2021, 40(3): 407-416.
- Lao Q B, Liu G Q, Gao J S, *et al.* Study on the characteristics and eutrophication of nutrients in the mariculture farms of Qinzhou bay, South China[J]. *Marine Environmental Science*, 2021, 40(3): 407-416 (in Chinese).
- [19] 栾青杉, 康元德, 王俊. 黄海浮游植物群落的长期变化(1985—2015)[J]. *中国水产科学*, 2020, 27(1): 1-11.
- Luan Q S, Kang Y D, Wang J. Long-term changes within the phytoplankton community in the Yellow Sea (1985-2015)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(1): 1-11 (in Chinese).
- [20] 于佐安, 李大成, 王笑月, 等. 长海县筏养虾夷扇贝大规模死亡原因探讨[J]. *水产科学*, 2019, 38(3): 420-427.
- Yu Z A, Li D C, Wang X Y, *et al.* Reason of massive mortality of Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* in raft cultivation in coastal Changhai county[J]. *Fisheries Science*, 2019, 38(3): 420-427 (in Chinese).
- [21] Oberbeckmann S, Fuchs B M, Meiners M, *et al.* Seasonal dynamics and modeling of a *Vibrio* community in coastal waters of the North Sea[J]. *Microbial Ecology*, 2012, 63(3): 543-551.
- [22] Froelich B A, Ayrapetyan M, Fowler P, *et al.* Development of a matrix tool for the prediction of *Vibrio* species in oysters harvested from North Carolina[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(3): 1111-1119.
- [23] Lokmer A, Wegner K M. Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection[J]. *The ISME Journal*, 2015, 9(3): 670-682.
- [24] Shan H W, Deng W H, Luan J B, *et al.* Thermal sensitivity of bacteriocytes constrains the persistence of intracellular bacteria in whitefly symbiosis under heat stress[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2017, 9(6): 706-716.
- [25] Egan S, Gardiner M. Microbial dysbiosis: rethinking disease in marine ecosystems[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 991.
- [26] Zhang H, Wang H, Chen H, *et al.* The transcriptional response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* under simultaneous bacterial and heat stresses[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2019, 94: 1-10.
- [27] Patrick S, Faury N, Gouletquer P. Seasonal changes in carbohydrate metabolism and its relationship with summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Marennes-Oléron Bay (France)[J]. *Aquaculture*, 2006, 252(2-4): 328-338.
- [28] Wang X Q, Wang L L, Zhang H, *et al.* Immune response and energy metabolism of *Chlamys farreri* under *Vibrio anguillarum* challenge and high temperature exposure[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 33(4): 1016-1026.
- [29] Wang X Q, Wang L L, Yao C, *et al.* Alternation of immune parameters and cellular energy allocation of *Chlamys farreri* under ammonia-N exposure and *Vibrio anguillarum* challenge[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(5): 741-749.
- [30] Pichaud N, Pellerin J, Fournier M, *et al.* Oxidative stress and immunologic responses following a dietary exposure to PAHs in *Mya arenaria*[J]. *Chemistry Central Journal*, 2008, 2(1): 23.
- [31] Ding F F, Li A, Cong R H, *et al.* The phenotypic and the genetic response to the extreme high temperature provides new insight into thermal tolerance for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2020, 7: 399.
- [32] 孟广玮, 李琪, 徐成勋, 等. 高温胁迫对长牡蛎“海大3号”品系存活及5项免疫指标的影响[J]. *中国水产科学*, 2019, 26(4): 738-744.
- Meng G W, Li Q, Xu C X, *et al.* Effects of high-temperature stress on survival and five immune indicators of Pacific oyster ‘Haida No. 3’[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(4): 738-744 (in Chinese).
- [33] Wang L L, Song X R, Song L S. The oyster immunity[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 80: 99-118.
- [34] Qu T, Huang B Y, Zhang L L, *et al.* Identification and functional characterization of two executioner caspases in *Crassostrea gigas*[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e89040.

Investigation on the variation of environmental factors, glycogen and immune parameters of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in the North Yellow Sea shellfish farming area in summer

GAO Lei¹, KONG Ning¹, LIU Ranyang¹, ZHAO Junyan¹, XING Zhen¹, ZHANG Ziyang¹,
ZHAO Bao¹, LI Qingsong¹, FU Qiang¹, WANG Wenbiao¹, LI Lei²,
WANG Lingling^{1*}, SONG Linsheng¹

(1. Liaoning Key Laboratory of Marine Animal Immunology and Disease Control,
Liaoning Key Laboratory of Marine Animal Immunology, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;
2. Dalian Yuyang Group Co., Ltd., Dalian 116499, China)

Abstract: Summer mass mortality is one of the major bottlenecks limiting the green and high-quality development of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* aquaculture in China. The frequent environmental stresses in summer, including high-temperature, rainfall, pathogen stimulation, picophytoplankton abundance and reproductive behavior, are important causes of mass mortality. Monitoring the changes of key environmental factors and health-related indicators in the aquaculture of *C. gigas* will help to forecast the risk of mass mortality. In this study, two surveys were conducted for *C. gigas* aquaculture in the North Yellow Sea during the summer heat and rainfall period to monitor the variations of water parameters, picophytoplankton abundance, bacterial abundance, glycogen content and immune-related indicators. It was found that, for the first and second survey in July, the surface water temperature was 25.3 and 24.9 °C, respectively. The salinity for the two surveys was 26.41 and 27.87, respectively. The abundance of diatoms for the two surveys was 3.6×10^3 and 3×10^3 cells/L, respectively, which was lower than the average level of previous reports, and the diversity of dinoflagellates increased. For the two surveys, the abundance of total bacteria in the water was 2.10×10^9 and 2.77×10^{10} copies/L, respectively, and the abundance of *Vibrio* was 3.37×10^8 and 5.40×10^8 copies/L, respectively. The glycogen content of hepatopancreas decreased to 40.96 and 31.58 mg/g respectively for the two surveys, and the glycogen content of adductor muscle decreased to 6.63 and 8.91 mg/g, respectively. MDA content in gill was 13.74 and 8.69 nmol/mg prot for the two surveys, respectively, and T-AOC in gill was 0.46 and 0.77 U/mg prot, respectively. The expression levels of *CgIL17-5* and *CgTNF-1* mRNA in haemocytes dramatically increased in the first survey compared to the oysters cultured indoor. The expression levels of *CgCaspase3* mRNA in haemocytes increased compared to the oysters cultured indoor, but the differences were not significant. In conclusion, the results showed higher water temperature and lower salinity happened in shellfish farming areas in the summer of 2021. The abundance of diatoms decreased compared to the average level of previous reports, and the diversity of dinoflagellates, a potentially harmful algae, increased. The abundance of environmental bacteria changed during the environmental stresses, and the risk of outbreak of potential pathogenic bacteria *Vibrio* increased. Organism responses were observed in oysters including lower glycogen content and mild oxidative stress. These results help us to further understand the environmental patterns and response characteristics of the organism during summer and provided a theoretical basis and reference for the prevention and control of the mass oyster mortality in summer.

Key words: *Crassostrea gigas*; high temperature; rainfall; glycogen; immune; North Yellow Sea

Corresponding author: WANG Lingling. E-mail: wanglingling@dlou.edu.cn

Funding projects: National Key Research and Development Program of China (2018YFD0900606); Funds for International Cooperation and Exchange of the National Natural Science Foundation of China (41961124009); China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-49); Dalian Science and Technology Innovation Fund Project (2021JJ13SN73); Liaoning Applied Basic Research Program (2022JH2/101300140)