

文章编号: 1004-0374(2011)04-0394-08

鱼类应激生物学研究与应用

赵建华^{1,2,3}, 杨德国^{1,2*}, 陈建武^{1,2}, 朱永久^{1,2}, 李 茜^{2,3}, 冯宪斌^{2,3}, 何勇凤^{1,2}, 吴兴兵^{1,2}

(1 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 无锡 214081; 2 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与利用重点开放实验室, 荆州 434000; 3 华中农业大学水产学院, 武汉 430070)

摘要: 近年来, 随着应激医学和动物应激生物学的发展, 鱼类应激生物学的研究越来越为人们所关注。该文阐述了应激的概念、鱼类应激的发生及危害, 主要从生理、行为方面介绍了目前国内外鱼类应激生物学最新的研究技术和方法, 从苗种培育和改良、药物缓解、改善养殖环境、科学管理与规范化操作等方面介绍了相应的缓解措施。文章最后分析了鱼类应激生物学研究存在的问题, 并对其发展前景进行了展望, 旨在总结鱼类应激生物学的研究状况, 为其在水产健康养殖及鱼类保护生物学等方面的研究与应用提供参考。

关键词: 鱼类; 应激; 缓解; 应用; 生理; 行为; 监测

中图分类号: S917; Q959.405 **文献标识码:** A

Research and application on the biology of fish stress

ZHAO Jian-Hua^{1,2,3}, YANG De-Guo^{1,2*}, CHEN Jian-Wu^{1,2}, ZHU Yong-Jiu^{1,2},
LI Xi^{2,3}, FENG Xian-Bin^{2,3}, HE Yong-Feng^{1,2}, WU Xing-Bing^{1,2}

(1 Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 2 Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation and Utilization, Ministry of Agriculture of China, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China; 3 College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Recently, with the development of stress medicine and the biology of animal stress, more and more attention has been paid on the research of the biology of fish stress. In the present study, the concept of stress, the occurrence and compromise of fish stress were expounded, and the recent techniques, methods on physiological, behavioral aspect of both domestic and international studies on fish stress were mainly introduced. We then displayed the mitigation measures including larval rearing and improvement, pharmacologic remission, improvement of cultural environment, scientific management and standardized handling. Finally, problems occurred during the process of the research on fish stress were analyzed in order to present the future prospects. The purpose of this study is to summarize the status of the researches on the biology of fish stress, and to provide basic reference for its research and application in healthy aquaculture and fish conservation biology.

Key words: fish; stress; mitigation; application; physiology; behavior; monitoring

应激是生物体生命活动的基本特征, 是生物适应性的一种表现形式和其得以生存、发展的基础。适度的应激可增强机体对环境的适应能力, 对生物体心理、生理功能均有促进作用; 而过度的应激往往会引发机体正常生理功能和行为的紊乱, 导致各种疾病或亚疾病状况的出现。近年来, 随着动物应

激日益受到人们关注, 国际上对鱼类应激的研究也

收稿日期: 2010-10-25; 修回日期: 2011-01-18

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目; 中国长江三峡集团公司(0714090)

*通讯作者: E-mail: yangdg@yfi.ac.cn

逐渐兴起。国外对鱼类应激生物学的研究始于 20 世纪 20 年代^[1], 多集中于水体理化因子及各种操作胁迫对鱼类生理、行为影响等方面, 尤其对鲑鳟鱼类的研究较为广泛和深入; 国内鱼类应激方面的文献记载最早见于 20 世纪 80 年代^[2,3], 直到 21 世纪初期开始显著增加, 但研究技术与水平相对落后, 研究广度与深度亟待拓展和深入。在现代集约化生产发展过程中与生态环境日趋恶化的形势下, 养殖密度过大、操作与管理不当、生存环境剧变等均可导致鱼类产生应激, 由此引发的疾病或死亡已对养殖业生产及物种生存造成巨大威胁。“2009 年水生动物应激与福利国际学术研讨会”上, 我国首次正式提出“水生动物应激与福利”的概念, 是对我国水生动物应激机理及鱼类应激反应调控机制研究的一大促进。正确理解和认识鱼类应激的发生及危害, 对其进行及时有效地监测, 并探索相应的缓解措施, 对当前形势下鱼类健康养殖、鱼病诊断、种质资源和珍稀濒危鱼类保护等方面具有重要意义。

1 鱼类应激的生物学反应

1.1 应激及其发展

“应激”(stress)一词由加拿大病理生理学家 Hans Selye 于 1936 年首次提出, 并将其分为惊恐、抵抗及衰竭三个阶段^[4], 这为后来的研究奠定了基础。在应激生物学发展过程中, 其研究涵盖了生理学、病理学、药理学、心理学、生物学、神经学和社会学等多个领域。由于应激发生机制的复杂性, 众多学者从不同角度和领域进行了研究, 提出了不同观点。目前, 广为人们接受的“应激”的概念为: 当机体内环境稳态受到威胁时, 机体对应激源产生特异性和(或)非特异性反应, 以维持机体新的稳态的过程^[4]。然而, “应激”的定义及其研究内容是开放和变化的, 随着应激生物学研究的不断深入, “应激”的定义必将更加科学、完善, 其研究内容将更加丰富。

1.2 鱼类应激的一般生物学反应及危害

1985 年 Moberg 提出的动物应激模型将应激反应划分为应激源识别、生物防御和应激反应结果三个阶段(图 1)。鱼类作为最古老的脊椎动物, 其应激反应的发生与人类和其他脊椎动物相似, 亦适用于这一模型^[5,6]。当鱼体中枢神经系统感受到内外界刺激后, 鱼体将从行为、生理(自主神经系统、神经—内分泌—免疫系统)等方面发生生物防御

反应。

行为反应是鱼类遭受刺激后最直接、快速的反应。自然环境下, 适当的行为反应是鱼类躲避或对应激源刺激的有效途径, 对鱼类在短期内恢复正常状态至关重要^[7]。然而, 现代集约化的养殖方式极大地限制了鱼类的行为反应, 常导致其行为异常或障碍, 引起生理系统的应激反应^[5]。

从生理学角度讲, 鱼类应激反应按其发生过程一般分为初级、次级和第三级应激反应^[7]。初级应激反应主要包括应激源的识别及生物防御的启动, 是机体在神经和内分泌系统水平上的反应, 其结果是激活了以鱼体交感—嗜铬组织系统(sympathetico-chromaffin system, SCS)和下丘脑—垂体—肾间组织(hypothalamic-pituitary-interrenal, HPI)轴为主的两个应激反应系统, 并促使鱼体血液儿茶酚胺、皮质醇等应激激素水平升高^[7,8]。次级应激反应是由初级应激反应所产生的应激激素调控的各种生理、生化反应过程, 包括呼吸系统、心血管系统、能量代谢、电解质平衡及免疫系统等生物学功能的改变。此阶段机体代谢的一个重要特征是以葡萄糖为代表的生物学资源发生重新分配以更好地对应激^[6]。第三级应激反应是在次级应激反应的基础上, 鱼体对应激源产生了适应性, 其生物学功能恢复正常; 或随应激程度的加深, 鱼类个体或群体水平上出现的诸如生长速率、繁殖能力及抗病能力降低等变化。

2 应激源的种类

鱼类生活的水环境相对陆地环境更为复杂和多变, 影响鱼类生长、生存的应激源大致可分为四类: 第一类为环境应激源, 主要包括有害的水体理化因子, 如水体的盐度、温度、DO、pH、氨氮、硫化氢等指标, 以及周围的光、声等刺激。此外, 由工业、农业及城市生活废水导致的重金属、石油、农药等污染也是重要的环境应激源^[9]。第二类为躯体性应激源, 主要包括集约化养殖条件下的拥挤与“禁锢”、捕捞、运输、人工催产等生产过程中不当的操作方式^[10]。第三类为生物性应激源, 主要包括病原生物的入侵、捕食、社会应激等^[11]。第四类为综合性应激源, 如气候变化、水利工程建设、航道运输、地质灾害等, 这些应激源会导致鱼类种群结构、栖息地、生长与繁殖、种质等多方面的变化^[12,13]。此外, 根据应激源作用强度和时间的长短, 可将应激分为急性应

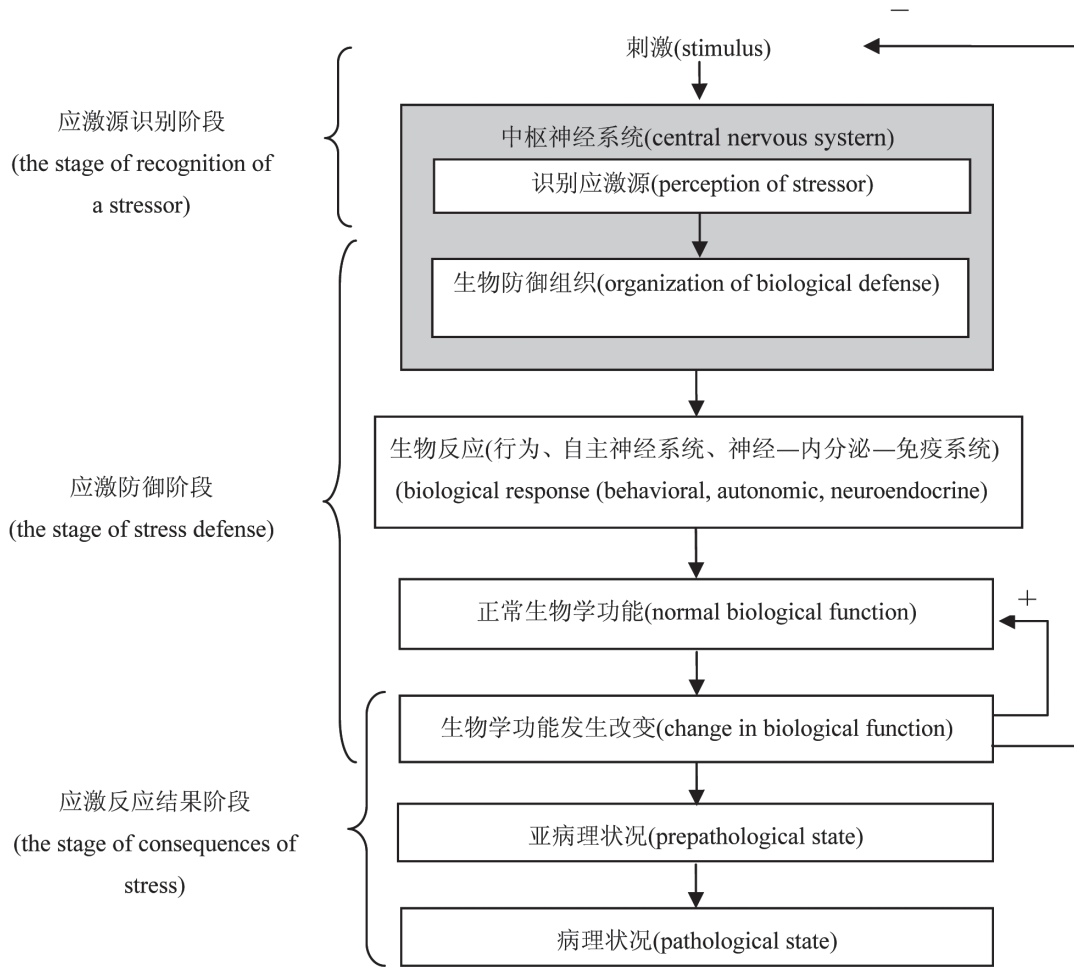


图1 动物应激的生物学反应模型(Moberg, 1985)

激(短期、剧烈的刺激)和慢性应激(长期、轻缓的刺激)。

3 鱼类应激反应研究技术与方法

目前,人们已从生理学、生物化学、行为学、心理学、神经内分泌学等多学科、多角度对鱼类应激生物学进行监测和研究,其研究技术与方法主要涵盖生理、行为以及多种技术与方法的综合运用等方面。

3.1 鱼类应激生理的研究

鱼类应激生理的研究主要涉及鱼类神经、内分泌、代谢、免疫系统等功能在应激反应中的变化情况,其中多数指标易于量化,是监测鱼类应激反应最为常用的方法,主要包括血液生理生化、细胞生物学、免疫学等指标的测定。

血液生理生化指标中,皮质醇激素因其稳定性好、升高幅度及持续时间与应激源强度及作用时间

呈正相关等特点,被公认为评价鱼类应激反应的良好指标,在鱼类应激监测与评价中研究得最为深入。应激反应中能量代谢方面的变化以血糖的升高为主要特征,其变化幅度与应激程度正相关,且升高的时效较血浆皮质醇迟缓^[14],也更容易测定,故血糖被广泛用作监测鱼类应激反应代谢变化状况的首要指标。此外,血细胞数目和大小、血细胞压积、血红蛋白、血液电解质、乳酸、脂类以及各种酶类的变化,在某种程度上也揭示了应激反应过程中鱼体生物学功能的变化情况,常被作为评价鱼类应激状况的辅助指标^[9,15,16]。

在细胞水平上,鱼类应激以相关应激蛋白(heat shock protein, HSP)表达量的增加为主要特征,这在一定程度上反映了组织细胞发生应激反应的强度和抵御不良刺激的能力,这方面以HSP70的研究最为深入。大量研究显示,应激蛋白在由水环境污染^[17]、病原体入侵^[18]等引起鱼类应激反应的监测

方面具有良好的指示作用。但已有的研究也显示, 操作胁迫并未引起虹鳟^[19]、大西洋鲑^[20] 鳃或肝组织应激蛋白的表达量变化; 氧胁迫或温度胁迫下尼罗罗非鱼^[21]、鲤鱼^[22]HSP70 的表达在不同组织亦存在差异。鱼类应激蛋白的表达不仅受鱼类种属、年龄、环境因子影响, 还与应激源性质等因素有关。将应激蛋白作为评价鱼类应激反应的统一指标为时尚早。随着分子生物学技术的发展, 基因芯片、基因组学和蛋白质功能组学等新兴技术将为解决这些问题提供技术支持^[10]。

氧化应激是机体细胞水平上最常见的应激, 是鱼类应激生物学研究领域的重要分支。关于鱼类氧化应激的研究兴起相对较晚, 但在环境污染物对鱼类应激损伤方面的研究发展较快。研究结果表明, 以过氧化脂质及其产物丙二醛^[23,24]、酶抗氧化系统(如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶等)^[25]、非酶抗氧化系统(如维生素C/E、谷胱甘肽)^[26]等作为氧化应激水平的量化指标, 能较好地反映鱼类氧化应激反应状况。

应激反应中鱼体免疫机能的改变与神经内分泌系统的变化通过细胞因子和激素进行相互调控, 是鱼类应激生物学研究的重点。研究人员已通过白细胞及淋巴细胞数目、溶菌酶活性、白细胞介素(IL)、肿瘤坏死因子(TNF)、巨噬细胞的呼吸爆发(RBA)等免疫学指标对不同应激源作用下的鲤鱼^[27,28]、虹鳟^[29,30]、大西洋鲑^[31]、金头鲷^[32]等多种鱼类的免疫功能变化做了大量的工作。这方面的研究在揭示鱼类应激反应过程中神经—内分泌—免疫系统、疾病之间调控作用及损伤机制方面都具有重要的推动作用。

3.2 鱼类应激行为的研究

鱼类和其他陆生脊椎动物一样具有一定的认知或感知能力^[33]。行为变化是鱼体遭受刺激后最直接、快速的反应。人们已通过直接观察、遥控监测等技术对实验室及野外条件下多种鱼类的呼吸频率、躲避和摄食行为、运动状况及对外界刺激的反射性反应等行为进行了研究^[34], 与生理指标的测定等方法相比, 该方法具有方便、快捷、简单、实用等优点。van Raaij 等^[35]根据鱼的逃跑行为、呼吸频率建立相应的行为参数, 对缺氧及恢复过程中的虹鳟进行了观测, 结果显示: 实验中存活的虹鳟在应激后没有恐慌行为, 表现得较为安静, 而最后死亡的虹鳟在应激后有较为剧烈的躲避行为, 且后者体内儿茶

酚胺及皮质醇含量均比前者高。Øverli 等^[36]、Kittilsen 等^[37]利用摄食行为(根据摄食积极性高低将其分为四个阶段并分别标以3、2、1、0相应分值)和活动量对新奇环境和急性“禁锢”胁迫下的虹鳟和大西洋鲑进行了研究。结果显示, 应激状态下雌雄虹鳟行为学反应差异明显; 不同家系大西洋鲑在急性胁迫状态下其活动量和皮质醇浓度均有显著升高, 且两者高度相关。以上研究结果表明, 应激反应中鱼类行为的变化与其认知、生理指标波动、应激损伤状况密切相关, 能够客观、形象地反映其应激状态与程度。然而, 目前的行为学测定方法受难以量化、不易建立统一的评价标准或体系等因素影响, 亟需从研究技术与方法上进行突破。

3.3 多种技术与方法的综合运用

由于鱼类应激反应的复杂性, 其监测亦涉及到多个领域。临床检验与病理学诊断、水环境监测等常规检测方法在鱼类应激反应的研究中也经常用到。近年来, 研究人员通过观察鱼类行为学变化, 并结合测定释放到水中或排泄物中的信息素(如皮质醇、褪黑激素、11-酮基睾酮等)浓度, 建立了无伤害性的鱼类应激反应监测方法(non-invasive measurement)^[38-40], 避免了其他监测方法, 如捕捞、采样等操作对鱼类造成的额外刺激, 更客观、真实地反映了鱼类的应激状况。多变量分析法(multivariate analysis)及新评估模型的应用为分析复杂多变的监测信息提供了强大支持^[41,42]。随着科技的进步, 遥控监测、生物传感器^[43]以及生物医学成像技术已越来越多地应用于鱼类应激生物学研究的相关领域, 并促进该领域的快速发展。

4 鱼类应激的缓解措施

开展鱼类应激生物学研究, 除要阐明其发生的机理、机制等理论问题外, 更重要的是寻找消除或减少鱼类应激反应的方法或措施。目前, 有关预防和缓解鱼类应激反应的措施, 主要包括苗种培育和改良、药物缓解、改善养殖环境、科学管理与规范化操作等四个方面。

4.1 苗种培育和改良

鱼类不同品种及个体间, 其应激反应强度存在差异, 且这种差异具有遗传性^[37,44], 可以通过品系选育、杂交育种、现代细胞工程和基因工程等手段, 定向培育抗应激鱼类新品种或家系。目前, 人们已对鲤鱼、虹鳟、金头鲷、大西洋鲑等鱼类进行了应

激耐受性选择实验^[45]。Øverli 等^[46]通过约 10 年的选择性改良, 培育出了高、低应激耐受性两个不同家系的虹鳟, 且这两个品系在食物利用率方面具有显著性差异。Ruiz-Gomez 等^[44]的研究结果显示, 虹鳟应对应激反应的行为策略具有可塑性。这说明, 通过适当的驯化, 可提高鱼体对应激的耐受性, 尤其鱼类早期阶段的应激经历(或建立的条件反射), 可增强其后期对应激的适应能力^[39]。

4.2 药物缓解

利用药物缓解鱼类应激反应是水产养殖生产中广泛应用的措施。目前, 常用的药物主要包括免疫增强剂、麻醉及镇静类药物。

4.2.1 免疫增强剂

中草药含有生物碱、多糖、皂苷、萜类、挥发油、有机酸等多种免疫活性物质, 这些物质通过不同的作用方式在提高机体免疫力、抗病、诱食、镇静等方面发挥重要作用^[47]。水产养殖中常用的中草药有“五黄”、板蓝根、大蒜、苦楝、苦参、金银花、五味子等。Ardó 等^[48]、Yin 等^[49]利用黄芪和金银花提取物作为饲料添加剂分别对尼罗罗非鱼、鲤鱼的免疫反应及嗜水气单胞杆菌攻毒后的保护性效应进行了研究, 结果表明, 黄芪和金银花显著地提高了两者血液吞噬细胞的吞噬作用和呼吸爆发活力, 降低了攻毒后鱼类的死亡率, 具有明显的免疫促进作用。此外, 维生素 C、E 及部分微量元素(硒、锌等)作为机体内重要的抗氧化剂, 在提高鱼体应激能力和免疫功能等方面亦具有重要作用^[50]。不过, 利用免疫增强剂来降低鱼类应激反应方面的研究与应用均刚起步, 是未来鱼类应激生物学研究的重要方向。

4.2.2 麻醉、镇静类药物

麻醉、镇静类药物可降低鱼体代谢水平及对刺激的敏感性, 常被用于疾病诊断与治疗、运输、标记、科研等过程, 以缓解操作刺激引起的应激反应, 减少对鱼体的损伤。目前, 水产常用麻醉药物主要有吸入型麻醉剂如 MS-222、丁香酚、苯唑卡因、2-苯氧乙醇、美托咪酯等, 其中以 MS-222 的应用最为广泛; 注射型麻醉剂有克他命、异丙酚等, 主要用于大型鱼类的麻醉^[51]。Pirhonen 等^[52]对 MS-222、丁香油及二氧化碳麻醉后硬头鳟的摄食量与血液皮质醇浓度作了研究。Zahl 等^[53]对苯唑卡因、MS-222、美托咪酯、2-苯氧乙醇四种麻醉剂在不同温度、体重及应激类型下对大西洋鲑麻醉效果进

行了研究。结果显示, 该类药物对鱼类应激反应具有良好的缓解作用, 且其作用效果因鱼种类、体重、水质状况(如水温、pH 等)、药物类别及浓度等因素而不同, 使用时应加以比对和筛选。

4.2 改善养殖环境

养殖环境是鱼类赖以生存的重要物质条件, 与应激的发生密切相关。良好的水质是保证鱼类健康生长的基本条件, 集约化养殖设施的结构、背景颜色、水流、水温、光照、养殖密度、规格及品种搭配等均可对鱼类的应激与福利产生影响^[54]。Papoutsoglou 等^[55]研究了黑、绿、白三种背景颜色对鲤鱼生长性能及生理指标的影响, 结果显示, 白色背景下鲤鱼特定生长率最高、食物利用率最低, 而黑色处理组则表现出相反的特点; 白色背景下鲤鱼血液 CO₂ 浓度和 pH 值分别较其他两处理组明显偏高和偏低。Dou 等^[56]对不同规格、底质、光照及养殖密度等条件下牙鲆的自相残食行为做了研究, 结果显示, 自相残食行为在规格不齐处理组出现的频率较规格整齐组高, 饥饿状态下光照处理组较黑暗处理组高, 而沙质底质和养殖密度对牙鲆自相残食行为影响较小。此外, 对陆生动物的研究发现, 利用环境丰富技术(environmental enhancement techniques)(如创造不同功能的生活区域、设置躲避场所等)增加动物生存的空间异质性, 可一定程度上缓解动物的应激反应^[6,57]。Gwak^[58]的研究证实, 遮蔽物的存在显著提高了美洲黑斑鱼幼鱼的特定生长率。这方面的研究在几种鲑科鱼类上也得到了验证^[59], 可能是今后需要加强研究的重要方向之一。

4.3 科学管理与规范化操作

渔业生产过程中的各个环节都可能会给鱼体带来不良刺激, 科学管理与规范化操作是缓解鱼类应激反应的重要内容, 对鱼类健康养殖具有重要的指导意义。这方面主要包括: 生产计划的制定, 养殖设施和生产工具的筛选, 科学的营养搭配及投喂技术, 及时巡塘, 适时分池、消毒及合理用药, 科学的捕捞与运输等。

5 鱼类应激生物学研究存在的问题及展望

(1) 在应激反应的发生机制方面, 虽然我们围绕鱼类 HPI 轴及皮质醇激素做了大量的研究, 但对神经—内分泌—免疫网络的调控机制尚未完全明确, 应激反应中鱼类认知、行为与生理变化之间的联系亟待深入研究。

(2) 鱼类应激反应的监测技术与方法尚不完善, 行为及心理应激难以量化, 没有形成统一的评价标准或指标体系。利用各种生物、医学技术对应激反应中鱼类生理、行为、认知等多种信息的变化进行综合分析, 能更加客观地阐明其应激机制, 是未来监测与评价鱼类应激反应的发展趋势。但从生产实践角度来看, 亟需通过诸如行为、形态变化等易于直接观察的临床症状建立一套便捷、实用的监测方法, 以更好地指导日常生产活动。

(3) 由于利益驱使、管理不善或操作不规范等因素, 我国鱼类应激缓解方面的问题尤为严峻。加强抗应激鱼类品种的选育、免疫增强剂特别是中草药等抗应激药物的研发, 加快鱼类应激与疾病发生的研究, 建立快速、有效的诊断治疗体系, 是当前缓解鱼类应激反应工作的当务之急。科学的管理与良好的操作规范始终是缓解鱼类应激反应的重要内容, 有待于进一步落实。此外, 对缓解鱼类应激反应的新型养殖设施、环境丰富技术等方面的探索, 也将会越来越为人们所关注。

(4) 我国鱼类应激生物学的研究起步较晚, 且大多只关注于应激的危害, 而对应激源、应激发生的机理等基本问题认识不足。提高人们对鱼类应激反应的理解和认识, 从生产实践的各个环节更好的认识、预防和对应激, 进而提高鱼类福利是鱼类应激生物学日趋发展和完善的必要条件。

(5) 加强当前情势下对海洋、江河和湖泊等水域野生鱼类, 特别是珍稀濒危鱼类应激反应的监测, 综合考虑各种大型水利工程建设、环境污染等活动对野生鱼类的影响, 并采取切实有效的应对措施对生物多样性保护和鱼类应激生物学的发展和应用均具有良好的促进作用。

[参 考 文 献]

- [1] Gutsell JS. Influence of certain water conditions, especially dissolved gasses, on trout. *Ecology*, 1929, 10(1): 77-96
- [2] 倪振坤. 鱼的应激反应. *水产科技情报*, 1987, (004): 30
- [3] 郭永灿. 水温对鲢鱼、草鱼胚胎发育的影响. *淡水渔业*, 1982, (3): 35-40
- [4] 严进, 路长林, 刘振全. 现代应激理论概述[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 4-7
- [5] Moberg G. Proceedings of the 19th U.S.-Japan natural resource meeting. NOAA technical report: stress induced pathologies in fish: the cost of stress[C]. Washington: NMFS, 1993, 111: 131-4
- [6] Moberg G, Mench J. The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare[M]. New York: CABI, 2000: 1-8
- [7] Iwama G, Afonso L, Vijayan M. Stress in fish. *Ann Acad Sci*, 1998, 851: 304-10
- [8] 刘小玲. 鱼类应激反应的研究. *水利渔业*, 2007, 27(03): 1-3
- [9] Simonato JD, Guedes CLB, Martinez CBR. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2008, 69(1): 112-20
- [10] Iwama G, Afonso L, Todgham A, et al. Are hsp70 suitable for indicating stressed states in fish? *J Exp Biol*, 2004, 207(1): 15
- [11] Iwama G, Vijayan M, Forsyth R, et al. Heat shock proteins and physiological stress in fish. *Integr Comp Biol*, 1999, 39(6): 901
- [12] 张志强, 孙成权. 全球变化研究十年新进展. *科学通报*, 1999, 44(005): 464-77
- [13] 胡应高. 鱼类的应激反应. *淡水渔业*, 2004, 34(4): 61-4
- [14] Lays N, Iversen M, Frantzen M, et al. Physiological stress responses in spotted wolffish (*Anarhichas minor*) subjected to acute disturbance and progressive hypoxia. *Aquaculture*, 2009, 295(1-2): 126-33
- [15] Fagundes M, Urbinati EC. Stress in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) during farming procedures. *Aquaculture*, 2008, 276(1-4): 112-9
- [16] Di Marco P, Priori A, Finioia MG, et al. Physiological responses of European sea bass *Dicentrarchus labrax* to different stocking densities and acute stress challenge. *Aquaculture*, 2008, 275(1-4): 319-28
- [17] Vijayan M, Pereira C, Kruzynski G, et al. Sublethal concentrations of contaminant induce the expression of hepatic heat shock protein 70 in two salmonids. *Aquat Toxicol*, 1998, 40(2-3): 101-8
- [18] Ackerman PA, Iwama GK. Physiological and cellular stress responses of juvenile rainbow trout to vibriosis. *J Aquat Anim Heal*, 2001, 13(2): 173-80
- [19] Vijayan MM, Pereira C, Forsyth RB, et al. Handling stress does not affect the expression of hepatic heat shock protein 70 and conjugation enzymes in rainbow trout treated with β -naphthoflavone. *Life Sci*, 1997, 61(2): 117-27
- [20] Zarate J, Bradley TM. Heat shock proteins are not sensitive indicators of hatchery stress in salmon. *Aquaculture*, 2003, 223(1-4): 175-87
- [21] Delaney MA, Klesius PH. Hypoxic conditions induce Hsp70 production in blood, brain and head kidney of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, 2004, 236(1-4): 633-44
- [22] Wang Y, Xu J, Sheng L, et al. Field and laboratory investigations of the thermal influence on tissue-specific Hsp70 levels in common carp (*Cyprinus carpio*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2007, 148(4): 821-7
- [23] Prieto AI, Pichardo S, Jos Á, et al. Time-dependent oxidative stress responses after acute exposure to toxic

- cyanobacterial cells containing microcystins in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) under laboratory conditions. *Aquat Toxicol*, 2007, 84(3): 337-45
- [24] Morales AE, Pérez-Jiménez A, Carmen Hidalgo M, et al. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dicentrarchus labrax* liver. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2004, 139(1-3): 153-61
- [25] Pandey S, Parvez S, Sayeed I, et al. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). *Sci Total Environ*, 2003, 309(1-3): 105-15
- [26] Guerriero G, Di Finizio A, Ciarcia G. Stress-induced changes of plasma antioxidants in aquacultured sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Comp Physiol A Mol Integr Physiol*, 2002, 132(1): 205-11
- [27] Verburg-van Kemenade B, Nowak B, Engelsma M, et al. Differential effects of cortisol on apoptosis and proliferation of carp B-lymphocytes from head kidney, spleen and blood. *Fish Shellfish Immunol*, 1999, 9(5): 405-15
- [28] Engelsma MY, Hougee S, Nap D, et al. Multiple acute temperature stress affects leucocyte populations and antibody responses in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Fish Shellfish Immunol*, 2003, 15(5): 397-410
- [29] Taylor JF, Needham MP, North BP, et al. The influence of ploidy on saltwater adaptation, acute stress response and immune function following seawater transfer in non-smolting rainbow trout. *Gen Comp Endocrinol*, 2007, 152(2-3): 314-25
- [30] Demers NE, Bayne CJ. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Dev Comp Immunol*, 1997, 21(4): 363-73
- [31] Fast MD, Hosoya S, Johnson SC, et al. Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short- and long-term stress. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 24(2): 194-204
- [32] Ortuno J, Esteban M, Meseguer J. Effects of short-term crowding stress on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response. *Fish Shellfish Immunol*, 2001, 11(2): 187-97
- [33] Volpato G. Challenges in assessing fish welfare. *ILAR J*, 2009, 50(4): 329-37
- [34] Brown C, Laland K, Krause J. *Fish cognition and behavior*[M]. Oxford: Blackwell Pub, 2006: 28-175
- [35] van Raaij M, Pit D, Balm P, et al. Behavioral strategy and the physiological stress response in rainbow trout exposed to severe hypoxia. *Horm Behav*, 1996, 30(1): 85-92
- [36] Øverli Ø, Sørensen C, Nilsson GE. Behavioral indicators of stress-coping style in rainbow trout: do males and females react differently to novelty? *Physiol Behav*, 2006, 87(3): 506-12
- [37] Kittilsen S, Ellis T, Schjolden J, et al. Determining stress-responsiveness in family groups of Atlantic salmon (*Salmo salar*) using non-invasive measures. *Aquaculture*, 2009, 298(1-2): 146-52
- [38] Ellis T, James J, Stewart C, et al. A non-invasive stress assay based upon measurement of free cortisol released into the water by rainbow trout. *J Fish Biol*, 2004, 65(5): 1233-52
- [39] Verbeek P, Iwamoto T, Murakami N. Variable stress-responsiveness in wild type and domesticated fighting fish. *Physiol Behav*, 2008, 93(1-2): 83-8
- [40] Ellis T, James J, Sundh H, et al. Non-invasive measurement of cortisol and melatonin in tanks stocked with seawater *Atlantic salmon*. *Aquaculture*, 2007, 272(1-4): 698-706
- [41] Turnbull J, Bell A, Adams C, et al. Stocking density and welfare of cage farmed *Atlantic salmon*: application of a multivariate analysis. *Aquaculture*, 2005, 243(1-4): 121-32
- [42] Varsamos S, Flik G, Pepin JF, et al. Husbandry stress during early life stages affects the stress response and health status of juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Fish Shellfish Immunol*, 2006, 20(1): 83-96
- [43] Yonemori Y, Takahashi E, Ren H, et al. Biosensor system for continuous glucose monitoring in fish. *Anal Chim Acta*, 2009, 633(1): 90-6
- [44] Ruiz-Gomez MdL, Kittilsen S, Höglund E, et al. Behavioral plasticity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with divergent coping styles: when doves become hawks. *Horom Behav*, 2008, 54(4): 534-8
- [45] Afonso J, Gines R, Montero D, et al. Seminar of the CIHEAM network on technology of aquaculture in the mediterranean (TECAM): selection programmes for stress tolerance in fish[C]. Zaragoza: CIHEAM-IAMZ, 1997
- [46] Øverli Ø, Sørensen C, Kiessling A, et al. Selection for improved stress tolerance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leads to reduced feed waste. *Aquaculture*, 2006, 261(2): 776-81
- [47] Lin H, Li Z, Chen Y, et al. Effect of dietary traditional Chinese medicines on apparent digestibility coefficients of nutrients for white shrimp *Litopenaeus vannamei*, Boone. *Aquaculture*, 2006, 253(1-4): 495-501
- [48] Ardó L, Yin G, Xu P, et al. Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance the non-specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 2008, 275(1-4): 26-33
- [49] Yin G, Ardo L, Thompson K, et al. Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune response of carp, *Cyprinus carpio*, and protection against *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol*, 2009, 26(1): 140-5
- [50] Montero D, Marrero M, Izquierdo MS, et al. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream *Sparus aurata*/juveniles subjected to crowding stress. *Aquaculture*, 1999, 171(3-4): 269-78
- [51] Murray MJ. Fish surgery. *Semin Avian Exotic Pet Med*, 2002, 11(4): 246-57
- [52] Pirhonen J, Schreck C. Effects of anaesthesia with MS-222, clove oil and CO₂ on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 2003, 220(1-4): 507-14
- [53] Zahl IH, Kiessling A, Samuelsen OB, et al. Anaesthesia of Atlantic cod (*Gadus morhua*) - effect of pre-anaesthetic

- sedation, and importance of body weight, temperature and stress. *Aquaculture*, 2009, 295(1-2): 52-9
- [54] Portz D, Woodley C, Cech J. Stress-associated impacts of short-term holding on fishes. *Rev Fish Biol Fish*, 2006, 16(2): 125-70
- [55] Papoutsoglou S, Mylonakis G, Miliou H, et al. Effects of background color on growth performances and physiological responses of scaled carp (*Cyprinus carpio* L.) reared in a closed circulated system. *Aquac Eng*, 2000, 22(4): 309-18
- [56] Dou S, Seikai T, Tsukamoto K. Cannibalism in Japanese flounder juveniles, *Paralichthys olivaceus*, reared under controlled conditions. *Aquaculture*, 2000, 182(1-2): 149-59
- [57] Newberry RC. Environmental enrichment: increasing the biological relevance of captive environments. *Appl Anim Behav Sci*, 1995, 44(2-4): 229-43
- [58] Gwak W. Effects of shelter on growth and survival in age-0 black sea bass, *Centropristis striata* (L.). *Aquac Res*, 2003, 34(15): 1387-90
- [59] Huntingford F, Adams C. Behavioural syndromes in farmed fish: implications for production and welfare. *Behaviour*, 2005, 9(10): 1207-21