



可在ScienceDirect上找到的目录列表

水产养殖

期刊主页: www.elsevier.com/locate/aquaculture

最终倒计时：在常规水产养殖实践前后及收获期间对养殖鱼类进行连续生理福利评估

Jeroen Brijsa, b, Erik Sandblomb, Michael Axelssonb, Kristina Sundellb, Henrik Sundh, b, 大卫·休本、罗西塔·布罗斯特罗姆、安德斯·基斯林、夏洛特·贝加、阿尔宾·格兰萨, *

瑞典农业科学大学动物环境与健康系, 瑞典斯卡拉SE-532 31

b瑞典哥德堡大学生物与环境科学系, 哥德堡SE-405-30

c瑞典乌普萨拉瑞典农业大学动物营养与管理系, SE-750 07, 瑞典

瑞典农业科学大学水生资源系, Drottningholm SE-17893, 瑞典

ARTICLE INFO

关键词:

压力

鱼类

心血管

激素遥测

ABSTRACT

养殖鱼类的福利已成为消费者、生产者、利益集团和当局日益关注的问题。为了提高鱼类福利, 需要找到能够早期识别压力情况的指标, 以便在有害影响发生前及时采取干预措施。通过使用心率生物记录器监测自由游动的虹鳟鱼 (*Oncorhynchus mykiss*), 结合血浆皮质醇水平和一系列血液学及血液化学参数, 我们评估了由一系列因素引起的应激反应的严重程度。

在收获前和收获期间的常见水产养殖实践。手术后, 运输和再...

在海洋笼中与同类动物一起饲养时, ~4天后, 心率趋于稳定, 并且出现了明显的心率昼夜节律 (即心率的平均昼夜波动范围为-25至27次/分钟)。这种心率昼夜节律的存在与否, 可以为水产养殖行业的研究人员提供信息, 帮助判断特定的养殖程序是否会导致不必要的长期压力。例如, 拥挤和运输等常见养殖实践导致的心率升高。心率分别比正常情况下高出-8次/分钟和9次/分钟, 这与血浆皮质醇水平的升高相吻合。压力性的农业实践或事件 (如在捆绑过程中暴露于空气中或水下缺氧, 这些情况会导致血浆皮质醇水平升高) 会引发低氧性心动过缓, 直到鱼被释放回有氧环境中, 此时心率显著增加以补偿累积的氧气债务。由多种农业实践 (如拥挤、捆绑和运输) 引起的反复压力显然具有累积性和长期影响, 心率比正常情况下高出-25次/分钟。次日早晨, 心率仍显著升高-9次/分钟, 这表明如果虹鳟鱼需要连续多天承受多重压力, 建议在不同压力之间提供足够的时间恢复。本研究表明, 心率监测对于评估海笼中自由游动鱼类的压力水平非常有用。此外, 使用可植入生物记录器开辟了广泛的应用范围, 使研究人员能够在更符合水产养殖业条件的情况下, 调查环境和/或人为压力对鱼类福利的影响。

1. 介绍

水产养殖是全球增长最快的动物性食品生产领域, 目前年产量已超过7600万吨 (粮农组织, 2017)。据估计, 2012年养殖鱼类的数量在37亿至120亿之间 (Mood和Brooke, 2012), 这一问题日益引起消费者、生产者、利益相关方及监管机构的关注 (Ashley, 2007; 欧洲食品安全局, 2009a; Frewer

(等, 2005; OIE, 2017)。

动物福利的概念复杂且多面。它被定义为动物适应环境并保持健康的能力, 动物能够过上自然的生活并表达其自然行为, 以及动物的主观心理状态 (Ashley, 2007; Broom, 1991a; Huntingford 等, 2006; Turnbull和Huntingford, 2012)。尽管身体健康普遍被认为是衡量福利的标准, 但鱼类是否也会经历心理痛苦 (例如。

albin.grans@slu.se通讯作者: 瑞典斯卡拉市动物环境与健康系, 邮政信箱234, 邮编532 23。电子邮箱地址: albin.grans@slu.se (A. Grans)。

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.081>

接收日期: 2018年1月17日; 修订版接收日期: 2018年6月27日; 接受日期: 2018年6月28日;

在线发布日期: 2018年6月30日

0044-8486/©2018 Elsevier B.V. 保留所有权利。

关于鱼类是否能体验疼痛或恐惧的问题一直存在争议 (Ashley, 2007; Turnbull和Huntingford, 2012)。这一争议的核心在于鱼类是否具备足够的认知和行为复杂性来体验情感 (Key, 2016; Rose等, 2014; Sneddon, 2015)。然而, 随着越来越多的证据表明鱼类确实具有这些能力, 目前的欧洲立法认为鱼类是有感知能力的生物, 可能确实能够感受到痛苦 (Braithwaite, 2010; 理事会指令98/58/EC, 1998; 欧洲委员会, 2005; Turnbull和Huntingford, 2012; Van de Vis等, 2012)。因此, 为了提供最佳实践和未来立法的建议, 需要进一步研究养殖鱼类的福利 (Ashley, 2007; EFSA, 2009b; Van de Vis等, 2012)。

目前, 鱼类的行为和生理应激反应常被用作评估福利状况的指标 (Ashley, 2007; Broom, 1991b; Huntingford等, 2006; Segner等, 2012)。鱼类的主要应激反应包括儿茶酚胺的释放和下丘脑-垂体-肾上腺轴的激活, 这会导致皮质类固醇的分泌。这引发了一系列次级反应, 如心肺活动增强、脾脏释放红细胞和能量储备的调动, 这些反应为在自然环境中面临挑战的个体提供了适应性功能 (Barton, 2002; Wendelaar-Bonga, 1997)。然而, 如果对鱼类施加长时间或反复的压力, 可能会导致有害的三级压力反应, 包括食欲下降、生长缓慢、游泳能力减弱、免疫反应受损、行为模式改变和繁殖能力下降 (Ashley, 2007; Huntingford等, 2006; Segner等, 2012)。这些三级压力反应通常被用作评估水产养殖中鱼类福利状况的指标。然而, 这些指标出现较晚, 难以确定压力反应的具体原因, 并且很难在这些负面影响发生前采取干预措施 (Huntingford等, 2006; Turnbull和Huntingford, 2012; Van de Vis等, 2012)。此外, 使用行为测量方法 (如: 通过观察行为变化、行为缺陷、注意力状态的变化、攻击水平以及个体的偏好和优先级, 研究在水产养殖设施现场进行鱼类福利调查时, 由于水体透明度差和高密度养殖等因素的影响。寻找不依赖于鱼类视觉观察或有害三级压力效应的替代福利指标尤为重要, 尤其是在屠宰前的最后几天。因为这些做法不仅对动物福利至关重要, 还直接影响最终产品的质量 (Ashley, 2007; Robb和Kestin, 2002)。

另一种现场调查鱼类福利的方法是使用可植入的生物遥测系统和生物记录器, 这些设备能够记录自由游动的鱼类在面对不同环境或人为压力时的心率、血流、肌肉运动和脑电图等生理指标 (Axelsson等, 2007; Clark等, 2010; Cooke等, 2004; Grans等, 2010; Hinch等)。2002年; Ropert-Coudert和Wilson, 2005年)。心率及其变异性作为压力的指标, 已被广泛应用于多种刺激条件下, 包括游泳活动、代谢率、食物摄入、消化过程和捕食者互动 (Altimiras和Larsen, 2000年; Armstrong, 1986年、1998年; Clark等人, 2010年; Grans等人, 2014年; Hojesjo等人, 1999年; Prystay等人, 2017年)。近年来, 生物记录器的创新和小型化技术 (如Star-Oddi DST milli-HRT记录器, Star-Oddi, 冰岛Gardabaer) 能够间歇性地测量心率、体温和时间, 这些记录器可以长时间 (几周几个月) 连续工作, 为现场研究提供了特别有前景的途径。这项技术不仅有助于识别 '在水产养殖环境中长期自由游泳且未受干扰的鱼类的正常生理模式', 还能帮助识别并分析由于环境或人为压力因素 (如捕捞期间的压力) 导致的模式偏差 (Lines

(斯宾塞, 2012; 罗佩特-科德特和威尔逊, 2005)。

本研究旨在探讨在自由游动的鱼类中监测心率是否可以作为压力的早期指标, 以及在常规水产养殖实践中, 特别是在收获前后, 评估虹鳟鱼 (*Oncorhynchus mykiss*) 在海笼中的福利状况。具体而言, 通过在选定的鱼身上植入心脏生物记录器, 我们监测了这些鱼在收获前的长时间心率和体温, 以研究手术恢复时间及重新引入海笼与同类的适应情况, 并识别 '正常的心率昼夜节律'。结合血浆皮质醇水平和一系列血液学及血液化学参数, 我们评估了多种常见于收获期间的养殖实践 (如拥挤、捆绑、船运和二氧化碳麻醉) 所引起的应激反应的严重程度。这些信息对于制定旨在改善鱼类福利、提高生产效率和管理系统的未来立法建议具有重要价值。

2. 材料和方法

2.1. 地点、实验动物和伦理声明

研究的实验部分于2016年8月31日至9月27日在芬兰奥兰群岛的布兰多拉克斯AB设施 (60.444674° N, 21.057210° E) 进行。实验使用了体质量在945至2952克之间的雌性虹鳟鱼 (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1972), 平均体重为1813 ± 36克。这些虹鳟鱼与-5000条同种虹鳟鱼 (总生物量-9500公斤) 一起, 被安置在一个直径40米、深4米的圆形海笼中, 该海笼固定在距离设施约100米的Djurholms Sound。所有实验方案均获得了奥兰省议会项目审批委员会 (决定2/2016) 的批准。

2.2. DST milli-HRT生物记录器的编程和外科植入

8月31日, 鳟鱼被少量地放入海笼中, ~40条鳟鱼被捆绑进一个较小的矩形海笼 (宽2米, 长6米, 深1米), 随后用船将其拖至Brando Lax AB设施。这些鳟鱼在此地禁食并饲养了1周。9月6日和7日, 20条体重在1024至2952克之间的鳟鱼 (平均值 ± 标准误)。从2082 ± 113克的样本中随机选取, 用于DST milli-HRT生物记录器 (型号: Logger 8 DM/CRC16/4800, 制造商: STAR-ODDI, 产地: 冰岛加尔达巴) 的外科植入手术。

DST千米-HRT生物记录器 (直径13.0毫米, 长度39.5毫米, 体积5立方厘米, 空气中质量11.8克) 通过单通道心电图 (ECG) 放大器监测心率。该放大器使用三个测量电极, 这些电极集成在陶瓷外壳中。每个记录的心率值都是从600次测量中的平均RR间隔 (即两次连续R波之间的时间) 得出的, 当采样频率为100赫兹时, 相当于6秒的时间。记录器的外壳内还装有一个温度传感器, 其分辨率为0.032° C, 精度为 ± 0.2° C。此外, 传感器内置了一个实时钟, 精度为 ± 1分钟/月。记录器使用Mercury v 4.28应用程序和通信盒 (STAR-ODDI, 冰岛加尔达巴) 进行编程。从9月6日 (早上6点开始) 到9月27日 (早上6点结束), 每10分钟记录一次心率和温度。在00:00开始, 每隔2分钟进行一次测量, 直至9月27日下午6点。上述时间及下文提及的所有时间均采用东欧夏令时 (EEST或UTC + 2)。

为了通过手术植入记录器, 首先将一条鳟鱼在装有Djurholms Sound水域水样的容器中进行麻醉。

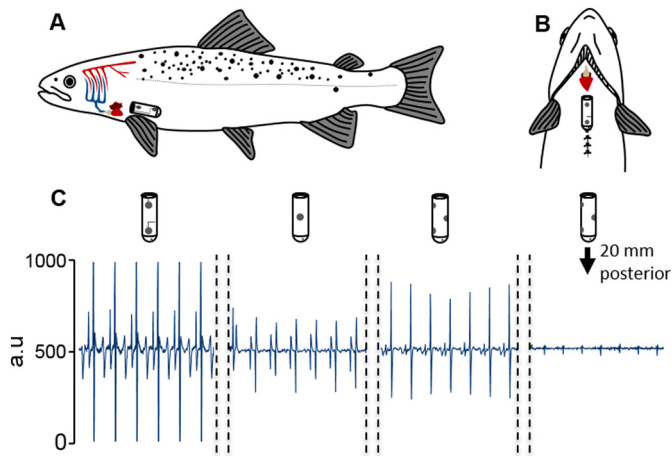


图1展示了生物记录器在虹鳟鱼 (*Oncorhynchus mykiss*) 腹腔内的放置位置, 包括(A)侧视图和(B)腹视图。(C)图中列出了四种不同的记录器位置及其对原始心电图信号强度的影响。记录器面向读者的一侧即为鱼的腹肌面, 而(C)图最右侧的面板显示了当记录器位于(A)和(B)所示位置后20毫米时的心电图信号强度。当记录器靠近心脏, 并且两个内置电极面向腹中线肌肉时, 心电图信号强度达到最佳状态 (见图C左侧面板)。

将150 mg/L的乙基-3-氨基苯甲酸甲磺酸(MS222, Sigma-Aldrich公司, 圣路易斯, 密苏里州, 美国)与300 mg/L的碳酸氢钠缓冲液混合。当鱼停止呼吸并被认为已达到手术麻醉状态时, 将其放置在覆盖有软泡沫的手术台上。为了维持麻醉效果和充足的氧气供应, 鳃部持续被提供含有75 mg/L MS222和150 mg/L碳酸氢钠缓冲液的充气水, 流速为10° C。首先, 在胸鳍后方40毫米处做一个25-30毫米的中腹切口, 然后将记录器以平端朝前的方式轻轻插入, 直至仅能看见记录器的圆端位于切口前端(图1A和B)。这样可以确保记录器紧贴心包。接着, 使用陶瓷套管提供的通道, 将记录器的圆端缝合到体壁上, 使包含两个心电图电极的一侧朝向腹部肌肉, 位于肝脏和肌肉组织之间(图1A和B)。此外, 还向腹腔内植入了一个12毫米的被动集成应答器标签(即PIT标签, Oregon RFID, Portland, Oregon, USA)。最后, 使用3-0无菌单丝不可吸收普罗林缝线材料(Ethicon Inc., Somerville, New Jersey, USA)进行间断缝合, 完成伤口的闭合。将Orabase®(一种保护性糊剂, 由瑞典Bromma的ConvaTec公司生产)、Pevaryl®(一种抗真菌剂, 由瑞典Solna的McNeil Sweden AB公司生产)和Bacibact®(一种抗菌剂, 由芬兰Espoo的Orion Corporation公司生产)混合后涂抹在伤口表面, 同时通过腹腔注射Baytril®兽用抗生素(一种广谱抗生素, 剂量为10 mg/kg, 由德国柏林的Bayer Healthcare公司生产)。在将个体放回小矩形海笼中恢复之前, 使用AKRA Dermojet Polymedical公司(法国巴托)生产的压力注射器注入Alcian blue染料, 在胸鳍之间的区域标记蓝色点。这样做是为了便于在屠宰过程中识别植入生物记录器的鳟鱼, 以便能够将其回收。

在一项初步研究中, 确定了生物记录器在信号质量和强度方面的最佳放置位置。研究使用了三只虹鳟鱼(568 ± 13 克), 将记录器固定在每条鱼的四个不同位置(图1C)。每个个体在特定位置的记录顺序是随机的, 记录器在每个位置至少记录10分钟的心率。随后

在插入记录器后, 麻醉的鱼被放置在手术台上, 腹部朝下, 记录至少10分钟的心率。随后, 缝线被剪断, 重复该过程, 每次将记录器置于不同的位置, 直到所有四个位置都进行了测试。通过分析每个心电图数据缓冲文件, 从视觉上确定了记录器的最佳位置。观察到, 心电图信号与记录器的方向和位置之间存在明显差异(图1C)。在所有三只鱼中, 当两个电极朝向腹部肌肉时, 心电图信号最强(即图1C最左侧的心电图段)。当记录器向后撤回20毫米远离心脏时, 心电图信号的幅度显著降低(即图1C最右侧的面板)。此外, 使用这些生物记录器的研究人员需要验证实验动物的多个心电图记录, 以确保记录器能够通过QRS波形间隔来计算心率。

2.3. 恢复期和屠宰程序期间的监测

9月9日(第0天), 带有生物记录器的鳟鱼与未安装仪器的其他鳟鱼一起, 通过布雷网被转移回含有~5000个同类的大海笼中。这些鳟鱼在海笼中恢复至9月25日(第16天), 期间每天一次自由进食, 使用丹麦奥胡斯的BioMar公司生产的商业鳟鱼颗粒, 遵循农场的标准喂养计划。

根据Brando Lax AB的屠宰前程序, 鳟鱼从9月20日(第11天)开始禁食(即在运输到屠宰场前一周)。9月26日(第17天), 从早上7点15分开始, 鳟鱼被低密度地聚集在一起。随机选取了20只个体(低密度聚集组), 用杆网小心地将它们从海笼中单独捕捞出来, 通过头部重击进行安乐死, 并使用肝素化的注射器从尾静脉采集2毫升血液样本。整个过程不到1分钟, 血液样本立即置于冰上, 以便进一步分析。

8点。15分, 为了提高鳟鱼的密度, 将海笼底部抬高。9点45分, 使用布雷网将鳟鱼从海笼转移到并船中。在此过程中, 再次随机选取了20只个体(高密度拥挤/布雷组), 这些个体被安乐死, 并以相同的方式采集血液样本。

上午10点至11点, 鳟鱼被通过运输船运送到Djurholm Sound, 最终抵达位于Brando Lax AB屠宰场旁的暂养笼。运输完成后, 从运输船组中随机选取了20条个体, 实施安乐死并采集血液样本。

上午11点55分, 并船中剩余的鳟鱼通过水槽被转移到屠宰场固定的暂养笼中, 并在夜间保持静止。9月27日(第18天)早晨开始屠宰前, 再次随机选取了20条个体作为预屠宰暂养组, 从海笼中小心地网出这些鱼, 实施安乐死并采集血液样本。

6点。52点, 屠宰开始。鳟鱼从暂养笼被拉到通往屠宰场水槽的通道, 水槽中充满了二氧化碳麻醉剂。鳟鱼被关在水槽里, 直到它们失去平衡, 被认为已经失去意识, 随后被机械地抬到一个标记为“鳃剪站”的网格上。工作人员手动剪断每条鱼的鳃弓和腹主动脉, 然后将它们转移到相邻的水槽中进行放血。从离开海笼到死亡的时间~4-8分钟。二氧化碳麻醉后, 直接从暂养笼中随机选取了20条鳟鱼(包括被拉和二氧化碳麻醉组), 实施安乐死并取样。

此外,当所有佩戴仪器的个体到达“切割站”时,在二氧化碳麻醉状态下取回生物记录器后,也采集了他们的血液样本。

2.4. 从DST milli-HRT生物记录器中检索和分析数据

从生物记录器中提取数据使用了Mercury v 4.28应用程序软件和配套的通信盒(STAR-ODDI,冰岛加尔达巴)。为了验证数据,所有记录的心率测量值都根据数据验证质量指数(QI)进行了分级,该指数范围为0到3,其中QI0表示优秀,QI1表示良好,QI2表示一般,QI3表示较差。为了确保最高的准确性,本研究仅采用了QI0等级的测量值(例如图1C的左侧面板)。通过仅选择QI0等级的测量值,我们使用了 $34.4 \pm 3.6\%$ 的采样数据。

对重新引入海笼的仪器化鲱鱼的心率进行分析,以评估与手术、运输和同种动物重新引入相关的压力恢复情况,并确定心率的平均昼夜节律。在重新引入海笼与开始收获程序之间的16天内,每天计算每个个体的平均心率,以及最低和最高20%的心率值。这些数据用于评估个体从上述压力源中恢复的情况,同时也作为休息和活动增加期间心率的良好近似。这有助于确定这些个体的心率平均昼夜节律。

在屠宰程序相关的两天内,还分析了装有仪器的鲱鱼的心率,以评估不同急性应激源的严重程度及其恢复情况。具体来说,在这两天中,分别在九个不同的“事件”时刻确定了装有仪器的鲱鱼的平均心率,这些事件对应于1)我们到达海笼前(即。1)未受干扰,2)在低密度拥挤期间,3)在低密度拥挤期间,4)从海笼到并船的固定过程中,5)在并船运输过程中,6)鲱鱼在固定并船上时,7)鲱鱼被释放到屠宰场旁的暂养笼后不久,8)正式屠宰程序开始前,9)固定和二氧化碳麻醉后。用于计算每个事件(事件1、2、3、5、7和8=1-6次测量,事件4、6和9=1-3次测量)个体平均心率的测量次数,根据事件的持续时间、采样分辨率以及使用QI0分级的心率值数量而有所不同。

为了确定每个“事件”引起的平均心率反应,我们比较了个体在屠宰前两天的每个“事件”期间的心率与他们“正常”的、昼夜节律的心率。这种“正常的心率昼夜节律”是通过计算每个个体在24小时内每10分钟的平均心率来确定的,这些数据来自第14天到第16天,因为这些日子最能代表鱼在屠宰过程中所处的条件,包括喂养状态和水温。

2.5. 血液分析

血液样本分析了红细胞压积(Hct,%)、血红蛋白浓度([Hb],g/dl)和总红细胞数(RBC, 10^6 个细胞/ μ l)。红细胞压积通过在80微升肝素化微量毛细管中,以10,000转/分钟的速度离心5分钟来测定。使用手持式Hb 201+测量仪(Hemocue®AB,Angelholm,瑞典)测定血红蛋白浓度,并根据鱼类血液进行了校正(Clark等,2008)。平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC,g/dl)通过[Hb]/Hct \times 100计算得出。红细胞

在Neubauer改进型血细胞计数板(Sigma-Aldrich公司,圣路易斯)的大中央方格内,于5个0.2平方毫米的次级方格中,以400 \times 放大倍率计数。美国密苏里州路易斯市)在用Natt-Herrick溶液稀释1:100后,计算总计数 \times 5000/

106(Huyben等,2017)。随后计算平均红细胞体积(MCV,单位:fl/细胞)和平均红细胞血红蛋白量(MCH,单位:pg/细胞),分别通过Hct/RBC \times 10和[Hb]/RBC \times 10得出。

血液分析后,血液样本在微离心机(Eppendorf®5415D,Sigma-Aldrich瑞典AB,斯德哥尔摩,瑞典)中以10000 rcf的速度离心5分钟,收集血浆并冷冻至-80°C,以备后续分析。血浆中的皮质醇浓度通过放射免疫测定法测定,该方法由Young(1986)描述,使用了从Guldhay有限公司(吉尔福德,萨里,英国)购买的皮质醇抗体(代码:S020;批号:1014-180182),并由Sundh等人(2011)验证。作为示踪剂,使用了氚标记的氢化可的松-[1,2,6,7-3H(N)](NET 396;NEN生命科学产品,波士顿,马萨诸塞州,美国),皮质醇标准品则由氢化可的松(Sigma,圣路易斯,密苏里州,美国)制备。放射性测定使用Wallac 1409液体闪烁计数器完成。该皮质醇放射免疫分析法的批内和批间变异系数(CV)分别为3.9%和5.4%,检测限为0.7 ng/ml(Sundh等,2011)。通过基于离子选择性电极技术的电解质分析仪(Convergys®ISE comfort电解质分析仪,Convergent Technologies,Colbe,德国),从100微升血浆样本中测定了钾(K⁺)、钠(Na⁺)、氯(Cl⁻)和钙(Ca²⁺)的浓度。

2.6. 统计分析

统计分析使用SPSS Statistics 21(IBM公司,纽约州阿蒙克市,美国)进行。所有用于统计分析的数据都经过评估,确保不违反所用模型的假设。如果假设被违反,则在下文描述具体的转换方法。统计分析得出的F值和P值将在文中报告,所有P值小于0.05的均被视为具有统计学意义。除非另有说明,因变量的值将以均值 \pm 标准误的形式报告。

为了对重新引入海笼至开始收获程序期间的仪器化鲱鱼的心率数据进行统计分析,我们采用了一种具有AR1重复协方差矩阵的一阶自回归(AR1)线性混合模型,因为时间相近的记录比时间间隔较长的记录更相关。该模型分别在喂食(即第1-10天)和禁食个体(即第11-16天)上运行,以避免喂食状态对心率的潜在影响。在这两个模型中,个体作为主要变量,重新引入海笼后的天数作为重复测量和固定因素,体温作为协变量,心率(例如最低20%、平均值和最高20%的平均值)作为因变量。然而,体温对喂食或禁食的鲱鱼的心率没有显著影响(可能是因为喂食和禁食期间的体温差异很小, -1.6°C),因此从模型中移除,这根据Akaike信息准则(AIC)提高了模型的拟合度。为了对在收获日发生的九个“事件”期间,佩戴仪器个体的心率数据进行统计分析,并与正常昼夜节律进行对比,我们采用了上述描述的线性混合模型。在这个模型中,我们将一天中的不同时间点作为重复测量,两天(收获日和正常昼夜节律日)以及这两天在每个时间点的交互作用作为固定效应。为了进一步比较两个线性混合模型中重复的因变量,我们使用了Bonferroni置信区间调整方法。

旨在确定是否存在任何具有统计学意义的体重、体长、血浆皮质醇、[Hb]、Hct、RBC差异

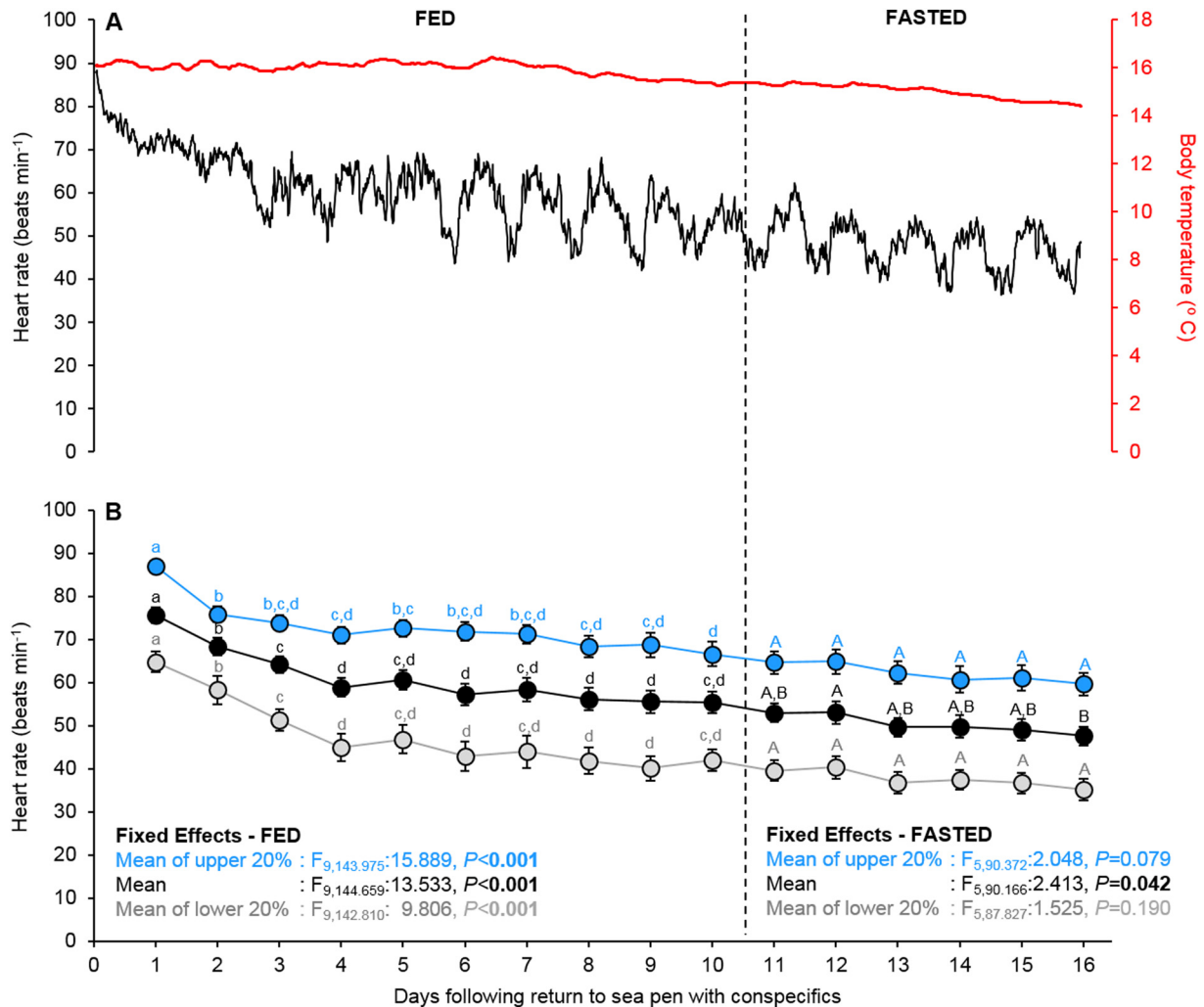


图2。(A) 鲑鱼 ($n = 20$) 在手术植入Star-Oddi DST milli-HRT生物记录器后, 重新引入海池与同类共处16天期间的每小时移动平均心率(黑线)和体温(红线)。(B) 16天内, 鲑鱼平均心率(黑圈和线)随时间的变化, 以及休息期(每日心率最低20%的平均值, 灰色圆圈和线)和活动增加期(每日心率最高20%的平均值, 红色圆圈和线)的心率变化。使用线性混合模型对鲑鱼在进食期和禁食期(由黑色垂直虚线分隔)的心率变化进行了统计分析, 不同的字母表示心率的显著差异($p < .05$, 小写字母: 进食期, 大写字母: 禁食期)。(关于图例中颜色的解释, 请参阅本文的网络版。)

在九个‘事件’中的五个, 我们对未使用仪器的鲑鱼血浆中的红细胞比容(MCHC)、平均红细胞体积(MCV)、平均红细胞血红蛋白含量(MCH)以及钠离子(Na^+)、钾离子(K^+)、钙离子(Ca^{2+})和氯离子(Cl^-)进行了单因素方差分析, 并进行了Tukey事后检验。对于不符合正态分布假设的变量, 我们采用了平方根变换(如血浆皮质醇)或自然对数转换(如MCHC、血浆钾离子 $[\text{K}^+]$ 和氯离子 $[\text{Cl}^-]$)。

3. 结果

3.1. 海笼中自由游动的虹鲑鱼的心率同种个体

对20条虹鲑鱼在海笼中的每小时移动平均心率进行视觉检查发现, 手术、运输和与同类重新引入海笼后, 需要超过3天的时间才能观察到清晰的心率昼夜节律(图2A)。这一结论进一步得到了喂食期(即第1-10天)心率统计分析的支持, 因为重新引入海笼后的4天内, 最低20%的心率值的平均值和每日心率的总体平均值显著下降(图2B)。4天后, 这些心率值在之后的几天里趋于稳定。

在40至47次/分钟和55至60次/分钟的频率下, 分别处于饱和期(图2B)。重新引入后的第一天, 最高20%的每日心率平均值显著下降, 之后在喂食期间的其余时间里, 心率在67至76次/分钟之间波动。在喂食期(第4至10天), 心率的昼夜波动(即最高20%与最低20%的平均值之差)为-27次/分钟。

在禁食期间(第11至16天), 平均心率保持在每分钟48到53次之间, 相对稳定。然而, 第12天的心率比第16天略高, 但差异显著(图2B)。在禁食期间, 每天心率最低和最高20%的平均值没有显著变化, 分别为每分钟35到40次和60到65次。这一时期, 心率的平均昼夜波动为-25次/分钟。

3.2. 虹鲑鱼屠宰过程中的应激反应

对屠宰前两天20条虹鲑鱼每小时移动平均心率的目视检查显示, 尽管心率反应因特定应激源而不同,

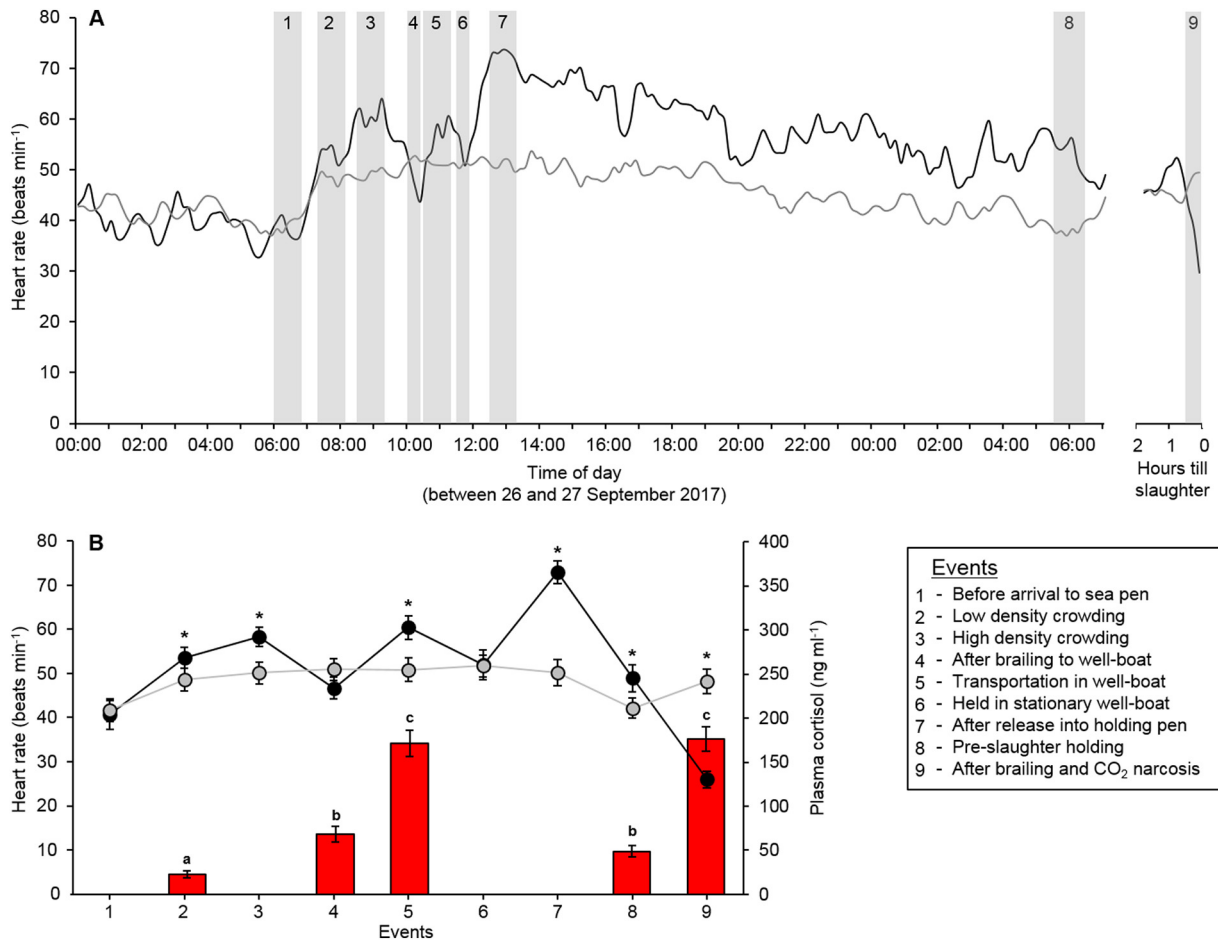


图3。(A) 鲑鱼 ($n = 20$) 在收获前最后两天的每小时移动平均心率 (黑线) 与之前观察到的 ‘正常、昼夜节律的心率’ (灰色线, 基于图2第14-16天的数据计算, 详见材料和方法部分) 的对比。(B) 在九个已识别事件期间的平均心率 (黑线和圆圈) 与之前观察到的 ‘正常、昼夜节律的心率’ (灰色线和圆圈) 的对比, 以及来自这九个事件中五个事件 (即事件2、4、5、8和9) 的鲑鱼亚样本的血浆皮质醇水平 (红色条形, 每个事件 $n=20$)。统计分析使用线性混合模型 (心率) 或单因素方差分析 (血浆皮质醇) 进行, 显著差异 ($p < .05$) 用* (心率) 或不同字母 (血浆皮质醇) 表示。(关于图例中颜色的解释, 请参阅本文的网络版本。)

总体心率通常高于正常的心率 (参见图3A中的黑线和灰线)。这一现象在统计分析中得到了进一步证实, 即在这一时期内, 特定 ‘事件’ 期间的平均心率 (图3B)。在并船到达海笼之前, 心率与正常昼夜节律无显著差异 (事件1, $P = .761$, 图3B)。然而, 随着并船的到来和海笼内低密度拥挤, 心率显著增加 (事件2, $P = .034$, 图3B), 并且随着拥挤密度的增加, 心率进一步上升 (事件3, $P = .003$, 图3B)。平均而言, 低密度和高密度拥挤分别导致心率升高~6次/分钟和8次/分钟。从海笼到并船的运输过程中, 心率随后下降, 不再显著高于正常昼夜节律 (事件4, $P = .473$, 图3B)。从海笼到屠宰场的并船运输过程中, 心率显著升高 (事件5, $P = .002$, 图3B), 平均心率比正常高出~9次/分钟。然而, 在鲑鱼被固定在并船期间, 水中的溶解氧浓度从8.83 mg/l (氧气饱和度为81.1%) 降至5.58 mg/l (氧气饱和度为55.3%), 这与心率下降有关, 此时心率与正常状态无显著差异 (事件6, $P = .447$, 图3B)。当鲑鱼被转移到屠宰场旁的暂养笼后, 心率显著回升, 并在~1小时后达到峰值, 数值为

~25次/分钟高于正常水平 (事件7, $P < .001$, 图3B)。次日早晨, 心率仍显著升高~9次/分钟 (事件8, $P = .003$, 图3B)。与正常昼夜节律相比, 盲法和二氧化碳麻醉的综合效果使心率显著降低~22次/分钟 (事件9, $P < .001$, 图3B)。

在已识别的9个事件中, 有5个事件 (即事件2、4、5、8和9) 确定了鲑鱼亚样本的血浆皮质醇水平。在初始低密度拥挤后测量的循环血浆皮质醇水平为 23 ± 4 ng/ml (事件2, 见图3B)。在低密度拥挤和鞭打的双重压力下, 血浆皮质醇水平显著增加了三倍 (事件4与事件2相比, $P < .001$, 图3B)。在运输过程中, 血浆皮质醇进一步增加, 达到 171 ± 15 ng/ml (事件5, $P < .001$, 图3B)。经过一夜在屠宰场附近的暂养笼中恢复后, 血浆皮质醇水平显著下降 (事件8, $P < .001$, 图3B), 但仍比前一天测得的最低水平高出两倍 ($P = .035$)。在鞭打和二氧化碳麻醉的双重压力下, 血浆皮质醇再次显著增加 (事件9, $P < .001$, 图3B), 达到了与前一天运输过程中的峰值反应相似的水平 (即事件5)。

未观察到Hct、[Hb]和RBC计数的显著变化

表1
在收获前最后两天的5个事件中，对虹鲟鱼的子样本进行了体测量、血液学参数和血浆离子浓度的测定。每个变量均采用单因素方差分析（ANOVA）进行统计分析，组间显著差异用不同字母表示（ $P < 0.05$ ）。

变量	离散分析		事件				
	<i>F</i>	<i>P</i>	低密度拥挤（事件2）	高密度拥挤/盲道（事件3和4）	船运（事件5）	屠宰前（事件8）	盲文和二氧化碳麻醉（事件9）
身体测量							
质量(g)	$F_{4,95} = 0.294$	0.881	1785 ± 92	1847 ± 91	1611 ± 69	1770 ± 76	1768 ± 48
长度(mm)	$F_{4,95} = 0.149$	0.963	459 ± 7	459 ± 7	449 ± 6	460 ± 6	460 ± 4
血液学参数							
[Hb] (g dl ⁻¹)	$F_{4,93} = 14.456$	< 0.001	8.6 ± 0.3 ^a	9.3 ± 0.3 ^a	9.6 ± 0.4 ^a	8.7 ± 0.3 ^a	11.2 ± 0.2 ^b
Hct (%)	$F_{4,93} = 20.664$	< 0.001	35.7 ± 1.4 ^a	40.3 ± 1.4 ^a	40.8 ± 1.8 ^a	36.9 ± 1.4 ^a	51.9 ± 1.1 ^b
计数 (106个细胞/微升)	$F_{4,94} = 9.722$	< 0.001	1.3 ± 0.1 ^a	1.3 ± 0.1 ^a	1.4 ± 0.1 ^a	1.3 ± 0.1 ^a	1.8 ± 0.1 ^b
MCHC (g Hb dl ⁻¹)	$F_{4,93} = 6.792$	< 0.001	24.2 ± 0.5 ^a	23.1 ± 0.3 ^a	23.7 ± 0.4 ^a	23.8 ± 0.5 ^a	21.7 ± 0.2 ^b
MCH (pg)	$F_{4,94} = 0.791$	0.534	69 ± 2	72 ± 2	69 ± 2	71 ± 4	65 ± 3
MCV (fl)	$F_{4,94} = 0.724$	0.578	288 ± 9	311 ± 11	292 ± 11	298 ± 14	298 ± 11
血浆离子浓度							
Na ⁺ (mM)	$F_{4,93} = 3.973$	0.005	179.7 ± 1.6 ^a	188.3 ± 1.9 ^b	185.5 ± 2.0 ^{a,b}	179.6 ± 3.4 ^a	187.7 ± 1.6 ^{a,b}
K ⁺ (mM)	$F_{4,92} = 6.224$	< 0.001	4.0 ± 0.2 ^a	2.6 ± 0.3 ^b	3.8 ± 0.2 ^a	3.3 ± 0.2 ^{a,b}	3.3 ± 0.2 ^a
Ca ²⁺ (mM)	$F_{4,93} = 7.382$	< 0.001	1.1 ± 0.1 ^a	1.2 ± 0.1 ^a	1.2 ± 0.1 ^a	1.1 ± 0.1 ^a	1.3 ± 0.1 ^b
Cl ⁻ (mM)	$F_{4,93} = 3.723$	0.007	113.7 ± 0.4 ^{a,b}	114.9 ± 0.4 ^{a,b}	115.2 ± 0.6 ^a	112.5 ± 1.0 ^{a,b}	112.4 ± 0.8 ^b

在低密度拥挤、高密度拥挤和捆绑的鱼类中，以及在船运和屠宰前的存放水平（事件2、4、5和8；表1）中，这些指标均有所下降。然而，在捆绑和二氧化碳麻醉后（事件9），红细胞比容（Hct）、血红蛋白浓度（[Hb]）和红细胞计数显著增加（所有变量 $P < .001$ ，表1）。这完全归因于红细胞计数的显著增加，因为平均红细胞体积（MCV）没有变化（ $P = .578$ ，表1）。平均红细胞血红蛋白量（MCH）也没有变化（ $P = .791$ ），而平均红细胞血红蛋白浓度（MCHC）在捆绑和二氧化碳麻醉后显著下降（ $P < .001$ ，表1）。在高密度拥挤和捆绑的综合压力下（事件3和4），血浆钠离子浓度（[Na⁺]）显著升高（ $P = .038$ ），而血浆钾离子浓度（[K⁺]）显著降低（ $P < .001$ ），与低密度拥挤期间的测量值相比（事件2；表1）。最后，钙离子浓度（[Ca²⁺]）在捆绑和二氧化碳麻醉后显著增加（事件9， $P < .001$ ，表1）。

4. 讨论

这是第一次监测水产养殖环境中自由游泳鱼类的心率和体温的研究。一旦虹鲟鱼从手术、运输和在海笼中与同类重新引入的综合压力中恢复（~4天），它们的心率表现出强烈的昼夜节律，白天的心率（~25次/分钟）高于夜晚。类似的心率昼夜节律之前也在野生环境中自由游动的棕鲟（*Salmo trutta*）中观察到，这很可能反映了日常活动的变化（Holliday等，1974；Priede，1978；Priede和Young，1977；Young等，1972）。尽管鲟鱼正常行为模式的中断可能是导致最初几天心率昼夜节律缺失的部分原因，但另一个可能的因素是，受压动物可能无法像健康未受压的动物那样有效控制心率（即心率变异性）。心率变异性（即心跳间隔时间的变化），由自主神经系统的活动控制，之前已被用作评估鱼类麻醉和手术后恢复水平的福利指标（Campbell等）。2004年；Grans等人，2014年）。然而，为了收集本研究所需的长期数据，必须节省生物记录器的电池和存储空间。因此，无法连续获取心电图，这阻碍了心率变异性的评估。尽管如此，直到鱼恢复之前，心率的昼夜节律并未显现。

由于上述压力源的综合作用，鱼类在水产养殖中是否存在或不存在心率昼夜节律，可能作为福利指标和恢复心率变异性的代理。尽管需要进一步研究环境和人为因素对鱼类心率昼夜节律的影响，但持续监测心率有助于识别可能导致不必要的长期压力（如心率昼夜节律缺失）的养殖常规和/或特定海笼位置（例如，在船只交通繁忙、噪音大、环境条件恶劣的区域）。此外，当使用心率来评估农业实践中不同压力源的严重程度时，很明显，需要考虑强烈的心率昼夜变化，因为这些通常发生的节律可能会对结果的解释产生偏差。

先前的研究表明，不同鱼类的心率通常与代谢率相关（Armstrong，1986；Campbell等，2004；Clark等，2005；Eliason等，2011），这为研究不同压力源对能量消耗的影响提供了机会，例如在各种常见的水产养殖实践和捕捞过程中所考察的压力源（Cooke等，2016）。虹鲟鱼在海笼中拥挤时，出现了显著的心动过速。类似的现象之前也在自由游动的成年银鲑（*Oncorhynchus kisutch*）中观察到，当它们被围栏时，心率从~30次/分钟增加到60次/分钟，水温~9° C（Donaldson等，2010）。尽管在本研究中，鲟鱼在高密度拥挤后的心率最大值相似，但考虑到自然昼夜节律对心率的影响，心率增加的幅度要小得多（~8次/分钟）。从目前的数据来看，无法确定这种超出‘正常昼夜节律心率’范围的心率增加对恢复时间或运动后心率增加的影响（Raby等，2015），但这一现象值得进一步研究。在其他鲑科鱼类中，有研究表明，对各种水产养殖和商业渔业相关压力源的反应导致的心率增加可能不是预测压力严重程度的有效指标，因为所有已检查的压力源都使心率从常规值大约翻了一倍（Cooke等，2001；Donaldson等，2010；Prystay等，2017；Raby等，2015）。然而，至少就本研究中由拥挤引起的应激而言，我们的数据显示，虹鲟鱼的心动过速反应随着

随着拥挤程度的增加,这种差异可能是因为我们的研究对象在拥挤时被~5000个同类包围(即数量带来的安全感),因此在网笼中对拥挤的压力反应可能是逐渐的。而在跑道中隔离和围捕较少的个体时,可能会导致更急性且强烈的反应(Donaldson等人,2010)。无论具体原因是什么,这里观察到的对拥挤的逐渐心率反应表明,通过生物记录心率来评估养殖鱼类的拥挤压力可能是一个有用的工具。

在盲化后,以及在他们被固定在静止的并船期间,心率显著降低,与正常的心率昼夜节律无异。仅从心率来看,这些事件似乎并未引发应激反应。然而,盲化后血浆皮质醇水平的显著升高表明情况并非如此。实际上,在这些压力事件中,心率的下降并不出乎意料,因为水下缺氧(即在静止的并船上)和空气暴露(即。在制动过程中,已知会触发低氧性心动过缓,这是由于刺激心脏起搏细胞上的毒蕈碱受体,导致心脏受到抑制性胆碱能(即迷走神经)张力的增加(Olson,1998;Randall,1982;Sandblom和Axelsson,2011;Wood和Shelton,1980;Wood等,1979)。这一发现与在并船运输过程中,当水中的氧气水平较高时,心率上升并达到与高密度拥挤相似水平的现象一致。这种心动过速可能是由于并船内的高密度拥挤和制动后因先前空气暴露而延迟的心率增加以偿还氧债务的共同作用(Prystay等,2017)。实际上,当鲑鱼从并船转移到屠宰场旁边的暂养笼时,也观察到了心率的延迟增加。尽管没有受到干扰,心率在释放后~1小时内继续上升,并达到了比之前任何个体应激因素更高的峰值。虽然先前多项研究(Donaldson等人,2010;Ekstrom等人,2016;Prystay等人,2017;Raby等人,2015)报告了在各种应激源后心动过速反应延迟,但导致这种延迟的潜在机制以及其如何受到非生物和生物因素的影响尚不清楚,需要进一步研究。

即使在从海笼运输到屠宰场的过程中,经历了由共同农业实践引起的多种压力因素,经过超过16小时的恢复期后,鱼的心率和血浆皮质醇水平仍然显著升高。根据前面讨论的结果,这并不令人意外,因为在手术、运输和重新引入同种鱼类到海笼时所经历的压力导致心率恢复和建立清晰的昼夜节律需要~4天。此外,先前的研究表明,即使是在单一的压力事件(如剧烈运动,长达16小时)或围栏活动(7.6小时和11小时)之后,鱼类的心率恢复时间也可能相当长。根据围栏时间的不同,需要5小时,而模拟垂钓活动则可能长达16小时(Anderson等人,1998;Donaldson等人,2010)。此外,虹鳟鱼在经历单一急性应激源,如网捕和限制时,其血浆皮质醇水平通常需要24小时才能恢复到应激前的水平,具体恢复时间取决于所施加的应激源(Huyben等人,2017;Pickering和Pottinger,1989;Procari等人,1999)。因此,鉴于动物的生理应激会影响市场产品的质量(Ashley,2007;Robb和Kestin,2002),在鱼类被运输到屠宰设施后,在开始屠宰程序之前,允许较长的恢复时间(例如,基于心率恢复的几天,而不是血浆皮质醇恢复的一天)可能是有益的。

屠宰前的最后程序包括在屠宰场附近的暂养笼中进行捆绑,以及通过浸入二氧化碳饱和水来麻醉。与之前的研究类似,在这些过程中,血浆皮质醇水平显著升高。

程序(Grans等人,2016;Sandblom等人,2013;Seth等人。2013年,心率急剧下降。这种反应可能是由于严重的酸中毒导致的心血管崩溃(Seth等人,2013)。此外,二氧化碳麻醉后,红细胞比容(Hct)和血红蛋白浓度([Hb])增加,这主要是因为循环中的红细胞增加了~40%。这可能是因为交感神经活动增强,导致脾脏收缩并释放红细胞(Pearson和Stevens,1991;Wendelaar-Bonga,1997)。急性应激后,平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)的下降通常归因于循环中儿茶酚胺水平的升高,导致红细胞膨胀(Nikimaa,1983)。然而,在本研究中,平均红细胞体积(MCV)没有显著变化,因此MCHC的下降可能是由于从脾脏释放的红细胞中,有大量未成熟的细胞,这些细胞含有较少的血红蛋白(Hardig和Hoglund,1983;Huyben等人,2017)。

5. 结论

本研究表明,生物记录器在调查环境和/或人为压力对鱼类福利的影响时是有用的。植入式生物记录器使研究人员能够持续在同一时间点收集个体的数据,而不仅仅是传统测量方法(如应激激素)提供的‘快照’。因此,使用生物记录器可以减少实验动物的数量,因为这种方法避免了因重复采样不同个体而导致的个体间显著差异,以及重复采样带来的累积采样误差风险。此外,生物记录器可以从未受干扰的鱼类中连续收集数据,这使得研究人员能够在长时间识别出在水产养殖环境中自由游动的鱼类的正常生理模式。本研究发现,在从多种应激源恢复后,鱼类的心率出现了明显的昼夜节律,这可能成为评估鱼类福利的一个有用指标。由于常见的养殖实践(如拥挤和运输)导致的应激源引起的心率升高与血浆皮质醇水平的增加相吻合,表明心率是评估海笼中自由游动鱼类在常氧条件下应激水平的有效工具。然而,心率并不是在引发低氧性心动过缓(如在布林和水下低氧环境中的空气暴露)时压力的合适预测指标。因此,我们建议研究人员在长时间监测心率的同时,也应监测海笼中的溶解氧水平,以帮助解释任何潜在的差异。血浆离子浓度和血液学参数的显著变化仅在一两次处理事件后才显现,因此这些参数可能也不适合作为鱼类福利的可靠指标。由多种养殖实践引起的反复压力显然具有累积性和长期影响,这一点从心率和血浆皮质醇水平的变化中可以确定。因此,当鱼类在一天或几天内连续受到多个压力源的影响时,强烈建议在不同压力源之间提供足够的恢复时间。鱼类植入式生物记录器的发展和改进为研究人员提供了广泛的应用范围,使他们能够在更符合水产养殖业实际情况的情况下,研究环境和/或人为压力对鱼类福利的影响。

致谢

作者们非常感谢Brando Lax AB(www.brandolax.fi)提供的现场设施和实验动物。我们还要感谢Linda Hasselberg-Frank提供的出色技术支持。本研究得到了农业科学与空间规划(Formas)、瑞典研究委员会(VR)、Helge Ax:son Johnson基金会以及Wilhelm和Martina Lundgrens基金会的资助。

参考文献

- Altimiras, J., Larsen, E., 2000. 心率和通气率的非侵入性记录。
- 彩虹鲷鱼在休息和游泳时。《鱼类生物学杂志》第57卷, 197-209页。
- 安德森, W., 布斯, R., 贝多, T., 麦金利, R., 芬斯塔德, B., 奥克兰, F., 斯克鲁顿, D., 1998年《远程监测心率作为大西洋斜坡恢复的指标》
- 鲑鱼 (*Salmo salar*, L.), 收录于《无脊椎动物与鱼类遥测技术进展》一书, 由 Springer出版社出版。
- pp. 233-240.
- 阿姆斯特朗, J., 1986. 心率作为活动、代谢率、食物摄入量和梭鱼 (*Esox lucius*) 的消化过程。《鱼类生物学杂志》第29卷, 207-221页。
- 阿姆斯特朗, J., 1998年. 梭鱼心率与代谢率之间的关系: in-现有数据的整合。《鱼类生物学杂志》第52卷, 362-368页。
- Ashley, P.J., 2007. 鱼类福利: 水产养殖中的当前问题。应用动物行为科学。104, 199-235.
- Axelsson, M., Dang, Q., Pitsillides, K., Munns, S., Hicks, J., Kassab, G.S., 2007. 一种新型, 用于测量血流的完全可植入式多通道生物遥测系统, 压力、心电图和体温。《应用生理学杂志》102卷, 1220-1228页。
- 巴顿, B.A., 2002年. 鱼类的压力: 多样化的反应, 特别是关于循环皮质类固醇的变化。《综合与比较生物学》第42卷, 517-525页。
- 布雷思韦特, V., 2010年. 鱼会感到疼痛吗? 牛津大学出版社, 牛津。
- 布鲁姆, D.M., 1991a. 动物福利: 概念与测量。《动物科学杂志》第69卷, 4167-4175页。
- 布鲁姆, D.M., 1991b. 福利和痛苦的评估。行为过程。25, 117-123.
- 坎贝尔H., 泰勒E., 埃金顿S., 2004年. 利用功率谱分析确定短角鱼 (*Myoxocephalus scorpius*) 的心肺控制机制。《实验生物学杂志》207卷, 1969-1976页。
- 克拉克, T.D., 瑞安, T., 英格拉姆, B., 沃克斯, A., 巴特勒, P., 弗拉佩尔, P.B., 2005. 呼吸因子的有氧范围不受温度影响, 主要受运动中默里鲱鱼 (*Macculllochella peelii peelii*) 心率调节。《生理学与生物化学动物学》78卷, 347-355页。
- 克拉克, T.D., 埃利森, E.J., 桑德布洛姆, E., 欣奇, S.G., 法雷尔, A.P., 2008. 用于鱼类血液的手持式血红蛋白分析仪的校准。《鱼类生物学杂志》73卷, 2587-2595页。
- 克拉克, T.D., 桑德布洛姆, E., 欣奇, S., 帕特森, D., 弗拉佩尔, P., 法雷尔, A., 2010. 自由游动的红鲱 (*Oncorhynchus nerka*) 心率和加速度的同时生物监测及其与能量消耗的关系。《J Comp Physiol B: Biochem Syst Env. Physiol.》180卷, 673-684页。
- 库克, S.J., 菲利普, D.P., 邓马尔, K.M., 施雷尔, J.F., 2001. 终端钩具对岩鲈鱼受伤、处理时间和心脏干扰的影响。《北美鱼类与人类杂志》第21卷, 333-342页。
- 库克, S.J., 索斯塔德, E.B., 欣奇, S.G., 2004年. 自由游动鱼类的活动与能量学: 心电图遥测技术的启示。《鱼类》杂志, 第5卷, 21-52页。
- 库克, S.J., 布朗斯科姆, J.W., 拉比, G.D., 布罗尔, F., 欣奇, S.G., 克拉克, T.D., 塞门斯, J.M., 2016. 野生鱼类远程生物能量测量: 机遇与挑战。《比较生物化学与生理学A: 分子整合生理学》202卷, 203-37页。
- 理事会指令98/58/EC, 1998年. 1998年7月20日关于保护用于农业目的的动物的理事会指令98/58/EC, 第23-37页。
- 欧洲委员会, 2005年. 《保护用于农业目的的动物的欧洲公约》(T-Ap) 常务委员会。见: 2005年12月5日常务委员会通过的关于养殖鱼类的建议, <http://www.coe.int/en/web/portal/home/>, 访问日期: 2017年11月7日。
- 唐纳森, M., 克拉克, T., 欣奇, S., 库克, S., 帕特森, D., 盖尔, M., 弗拉佩尔, P., 法雷尔, A., 2010. 自由游动的成年银鲑对模拟捕食者和渔业遭遇的生理反应。《生理学与生物化学动物学》第83卷, 973-983页。
- 欧洲食品安全局 (EFSA) 于2009年发布了《动物健康与福利小组对欧盟委员会关于鱼类福利总体方法及鱼类感知能力概念的请求的科学意见》。该意见发表于《欧洲食品安全局杂志》第954期 (2009年), 页码1至26。
- 欧洲食品安全局 (EFSA) 于2009年发布了由AHAW小组编制的《关于养殖鱼类福利的知识缺口与研究需求的声明》。该声明发表于《欧洲食品安全局杂志》第1145期 (2009年), 页码1至7。
- 埃克斯特罗姆A., 朱特费尔特F., 桑德斯特罗姆L.F., 阿迪尔A., 阿霍T., 桑德布洛姆E., 2016. 慢性环境变暖改变欧洲鲈鱼 (*Perca fluviatilis*) 的心血管和血液学应激反应。《比较生理学B》186卷, 第1023-1031页。
- Eliason, E.J., Clark, T.D., Hague, M.J., Hanson, L.M., Gallagher, Z.S., Jeffries, K.M., Gale, M.K., Patterson, D.A., Hinch, S.G., Farrell, A.P., 2011. 红鲱鱼种群间耐热性差异的。《科学》杂志332卷, 第109-112页。
- 粮农组织 (FAO), 2017年. 《水产养殖》<http://www.fao.org/aquaculture/en/> (访问日期11.07.2017)。
- 弗鲁尔, L.J., 科勒, A., 范德克伦, S.M.A., 德劳韦尔, C., 2005年. 消费者对动物友好型畜牧业系统发展的态度。《农业环境伦理学杂志》第18卷, 345-367页。
- 格兰斯A., 奥尔松C., 皮西利迪斯K., 尼尔森H.E., 切赫J.J., 阿克塞尔松M., 2010. 使用生物遥测技术结合标准方法研究喂食对白鲟 (*Acipenser transmontanus*) 体温调节行为及肠道血流的影响。《实验生物学杂志》213卷, 3198-3206页。
- 格兰斯, A., 桑德布洛姆, E., 基斯林, A., 阿克塞尔松, M., 2014. 鲑鱼术后镇痛: 减少的心肺活动是动物福利改善的标志, 还是阿片类药物的不良反应? PLoS One 9. 格兰斯, A., 尼克拉松, L., 桑德布洛姆, E., 桑德尔, K., 阿尔格斯, B., 伯格, C., 伦德, T.
- Axelsson, M., Sundh, H., Kiessling, A., 2016. 电击或二氧化碳对鱼类行为和生理应激反应的影响: 矛盾的结果。《动物》第10卷, 294-301页。
- 哈迪格, J., 霍格伦德, L.B., 1983. 关于鱼类血液变量估计的准确性。Comp.《生物化学与生理学A》第75卷, 35-40页。
- 欣奇, S.G., 斯坦登, E.M., 希利, M.C., 法雷尔, A.P., 2002. 上游迁徙的成年粉红鲱 (*Oncorhynchus gorbuscha*) 和红鲱 (*O.*) 的游泳模式与行为。 (*nerka*) 通过EMG遥测技术在不列颠哥伦比亚省弗雷泽河中评估的鲑鱼,
- 加拿大. Aquat Tel. 斯普林格出版社, 第147至160页。
- 霍耶斯乔, J., 约翰松, J.L., 阿克塞尔松, M., 1999年. 食物限制与捕食风险对行为及心率的影响: 虹鲱鱼的实验研究。《鱼类生物学杂志》第55卷, 1009-1019页。
- 霍利迪, F.G.T., 泰特勒, P., 杨, A.H., 1974年. 《斯特林艾斯雷湖及金罗斯洛赫莱文的鲑鱼 (*Salmo trutta*) 活性水平》。《爱丁堡皇家学会学报》第74卷B辑, 315-331页。
- 亨廷福德, F.A., 亚当斯, C., 布雷思韦特, V.A., 卡德里, S., 波特金, T.G., 桑多, P., 特恩布尔, J.F., 2006. 《鱼类福利的当前问题》, 载于《鱼类生物学杂志》第68卷, 第332-372页。
- 胡本, D., 维达科维奇, A., 尼曼, A., 兰格兰德, M., 伦德, T., 基斯林, A., 2017. 膳食酵母添加与急性应激对虹鲱鱼背主动脉插管餐后全血谱的影响。《鱼类生理学与生物化学》第43卷, 421-434页。
- Key, B., 2016. 《为什么鱼不会感到疼痛》。《动物情感》, 第1卷, 第1期。
- Line, J. and Spence, J., 2012年, 《保护养殖鱼类在收获时的福利》, 《鱼类生理学》与生物化学》第38卷, 第153-162页。
- 莫德, A. 和布鲁克, P., 2012年. 《估算全球水产养殖中每年被杀的养殖鱼类数量》。Fishcount.org.uk. 英国1。
- Nikmaa, M., 1983. 肾上腺素能调节虹鲱鱼红细胞中血红蛋白氧亲和力。《比较生理学杂志》152, 67-72。
- 世界动物卫生组织 (OIE) 于2017年发布了《水生动物健康守则》。访问网址: <http://www.oie.int/international-standard-setting/aquatic-code/access-online/>, 访问日期: 2017年11月7日。
- 奥尔森, K.R., 1998年. 心血管系统。见: 埃文斯, D.H. (编), 《鱼类生理学》。CRC 出版社有限责任公司, FL, 美国。
- 皮尔森, M., 史蒂文斯, E., 1991年. 虹鲱鱼 (*Oncorhynchus mykiss*) 脾脏红细胞库的大小及其对血液学的影响。《鱼类生理与生物化学》第9卷, 39-50页。
- 皮克林, A., 波特格, T., 1989. 鲑科鱼类的压力反应与疾病抗性: 血浆皮质醇长期升高影响。《鱼类生理学》第7卷, 253-258页。
- 普赖德, I.G., 1978年. 鱼类在自然环境中的行为与生理节律——通过超声波心率遥测技术揭示。收录于索普, S. (编), 《鱼类的节律活动》一书, 学术出版社, 纽约。
- 普赖德, I.G., 杨, A.H., 1977年. 《野生棕鲈 (*Salmo trutta* L.) 心脏节律的超声波遥测技术作为生物能量学与行为的指标》。《鱼类生物学杂志》第10卷, 299-318页。
- 普罗卡里奥尼, L.S., 巴里, T.P., 马利森, J.A., 1999. 高密度饲养和高负荷率对幼年虹鲱鱼生长及应激反应的影响。《北美水产养殖杂志》第61卷, 第91-96页。
- 普里斯泰, T.S., 埃利森, E.J., 劳伦斯, M.J., 迪克, M., 布朗斯科姆, J.W., 帕特森, D.A., 克罗斯林, G.T., 欣奇, S.G., 库克, S.J., 2017. 水温对模拟渔业互动后红鲱鱼心率恢复的影响。《康生理学》5.
- 拉比, G.D., 克拉克, T.D., 法雷尔, A.P., 帕特森, D.A., 贝特, N.N., 威尔逊, S.M., 威尔莫尔, W.G., 苏斯基, C.D., 欣奇, S.G., 库克, S.J., 2015. 面对河流考验: 理解渔业捕捞和水温对银鲑生理的影响。PLoS One 10, e0124023.
- 兰德, D., 1982年. 《运动和缺氧条件下鱼类呼吸与循环的调控》。《实验生物学杂志》第100卷, 275-288页。
- 罗布, D., 凯斯汀, S., 2002年. 用于杀死鱼类的方法: 实地观察与文献综述。《动物福利》第11卷, 269-282页。
- 罗伯特·科德特, Y., 威尔逊, R.P., 2005. 动物附着再利用的趋势与展望。《生态与环境学报》第3卷, 第437-444页。
- 罗斯, J., 阿林豪斯, R., 库克, S.J. Diggles, B., Sawynok, W., Stevens, E., Wynne, C.
- 2014年, 《鱼》杂志第15卷, 第97至133页。
- Sandblom, E., Axelsson, M., 2011. 鱼类循环的自主控制: 比较研究。《视图》。《Auton神经学》第165卷, 127-139页。
- 桑德布洛姆, E., 塞恩, H., 桑德赫, H., 桑德尔, K., 阿克塞尔松, M., 基斯林, A., 2013. 压力
- 高二氧化碳条件下北极红点鲑 (*Salvelinus alpinus* L.) 的反应与水产养殖相关的动员。《水产养殖》第414卷, 254-259页。
- 塞格纳, H.; 桑德, H.; 布赫曼, K.; 杜夫菲尔, J.; 桑德尔, K.S.; 马蒂厄, C.; 鲁安, N.; 尤特费尔特, F.; 托芬, H.; 沃恩, L., 2012年. 养殖鱼类健康: 其与鱼类福利的关系及其作为福利指标的效用。《鱼类生理学》与生物化学》38卷, 第85-105页。
- Seth, H., Axelsson, M., Sundh, H., Sundell, K., Kiessling, A., Sandblom, E., 2013年.
- 北极红点鲑 (*Salvelinus alpinus*) 在两种温度下快速低温和高浓度二氧化碳固定化引起的生理反应及其福利影响。《水产养殖》第402卷, 146-151页。
- 斯内登, L.U., 2015. 水生动物的疼痛。《实验生物学杂志》第218卷, 第967-976页。
- 桑德赫, H., 卡拉布雷斯, S., 朱特费尔特, F., 尼克拉松, L., 奥尔森, R.-E., 桑德尔, K., 2011年.
- 传染性胰腺坏死病毒在大西洋鲑鱼 (*Salmo salar* L.) 肠上皮中的转运。水产养殖 321, 85-92。
- Turnbull, J.F., Huntingford, F.A., 2012年, 《福利与水产养殖: BENEFISH 的定位》。
- 水产养殖经济学与管理学, 第16卷, 433-440页。
- 范德维森, J.W. 波尔曼, M., 兰布伊, E., 贝古, M.-L., 皮拉克, M., 2012. 鱼类福利保障系统: 建立公司层面有效工具以保护和监测养殖鱼类福利的初步步骤。《鱼类生理与生物化学》38卷, 243-257页。
- 温德拉尔-邦加, S.E., 1997年, 《鱼类的应激反应》, 《生理学评论》第77卷, 第591至625页。
- 伍德, C.M., 谢尔顿, G., 1980年. 虹鲱鱼心率和心输出量的反射控制: 缺氧、出血及全身血管张力的交互影响。《实验生物学杂志》第87卷, 271-284页。
- 伍德, C.M., 皮普拉克, P., 特罗特, J., 1979. 温度和贫血对虹鲱鱼心率控制的肾上腺素能和胆碱能机制的影响。《加拿大动物学杂志》57卷, 2440-2447页。
- 杨, G., 1986. 鲑鱼 (*Oncorhynchus kisutch*) 幼鲑化期间肾间质体外皮质醇分泌与血浆甲状腺素及皮质醇的关系。《基因与综合内分泌学》63卷, 191-200页。
- 杨, A.H., 泰特勒, P., 霍利迪, F.G.T., 麦克法兰, A., 1972年. 一种用于测量鱼类运动行为的小型声学标签。《鱼类生物学杂志》第4卷, 57-65页。