

微囊藻对银鲫生长和消化酶活性的影响及毒素积累

姚雁鸿^{1,2}, 余来宁³, 何文辉⁴, 李谷¹, 罗晓松¹

(1. 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 湖北 荆州 434000; 2. 华中农业大学 水产学院, 湖北 武汉 430070; 3. 江汉大学 医学与生命科学院, 湖北 武汉 430056; 4. 上海水产大学 生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘要:研究了淡水常见养殖品种银鲫 (*Carassius auratus*) 在有毒微囊藻环境条件下的生长和消化酶活性以及微囊藻毒素在鱼体内的积累情况。实验分为添加有毒微囊藻的实验组和不添加微囊藻的对照组 2 组, 每组设 3 个平行, 每个平行 10 尾银鲫, 实验周期 42 d。结果表明, 有毒微囊藻能够极显著的抑制银鲫的生长 ($P < 0.01$), 添加微囊藻实验组的增重率为 38.6%, 不添加微囊藻的增重率为 87.70%; 有毒微囊藻能显著降低银鲫的消化酶活性 ($P < 0.05$), 添加微囊藻的实验组的银鲫的肠、肝胰脏蛋白酶活性和肠、肝胰脏淀粉酶活性分别是对应不添加微囊藻的对照组活性的 60.6%、71.3%、65.4%、68.2%; 而且毒素会最终在银鲫体内积累, 并可通过食物链传到人类, 从而对人类构成潜在的风险。因此, 养殖水体微囊藻水华应该被引起足够重视。[中国水产科学, 2007, 14 (6): 969–973]

关键词: 银鲫; 微囊藻; 生长; 消化酶活性; 微囊藻毒素; 积累

中图分类号: X171.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005–8737–(2007)06–0969–05

蓝藻广泛分布于各类富营养化咸、淡水水体中^[1], 在夏、秋季节的水产养殖池塘中蓝藻一般是藻类最主要的组成部分, 常形成水华^[2], 而微囊藻水华又是蓝藻水华的最常见形式。当微囊藻大量繁殖形成水华时, 不但会污染水环境, 而且严重影响鱼类生长。当水华消失时, 大量微囊藻的腐败分解又会造成水体缺氧或产生有毒物质, 再次危及鱼类生存^[3]。

很多种类的水华微囊藻是产毒种, 常见的毒素是肝毒素 Microcystin (MC)。目前已有大量关于 MC 对鱼类产生毒害的文献报道, 如 MC 处理可以导致鱼类肝、肾、鳃、血液循环系统、消化器官、免疫系统等产生损害, 并进一步导致鱼类产生一系列行为学改变, 具体表现为过度通气, 腹部缩紧, 颜色变黑; 集群活动减少, 游动迟缓, 常停留在靠近水面的地方^[4–5]。但关于水华微囊藻对养殖鱼类生长和消化酶活性的影响研究少有报道, 只有陈少莲等^[6]研究了鲢、鳙对微囊藻的消化利用, Bury 等^[7]、Zhao 等^[8]等研究了饲料中添加有毒微囊藻对虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、欧鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 生长的影响, 迄今为止尚未见关于环境微囊藻与养

殖鱼类消化酶活性相关性的报道。本研究以淡水主养品种银鲫 (*Carassius auratus*) 为对象考察有毒水华微囊藻环境对养殖鱼类生长、消化酶活性的影响及毒素积累风险, 旨为深入了解微囊藻对鱼类的毒害机理提供初步参考资料。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用银鲫取自昆明大华养殖场, 体质量为 6~7 g, 该养殖场可引入水质较好的外来水源用于调控水质, 所以其养殖池塘很少受蓝藻影响; 饲料为从市场购入的颗粒饲料。实验用微囊藻 (鲜藻浆) 取自昆明海埂村池塘。

1.2 实验方法

1.2.1 生长 在室内玻璃水族箱 (100 cm × 60 cm × 70 cm) 内进行, 银鲫运回后先在玻璃水族箱内驯化 1 周, 后停食 1 d, 然后取 60 尾称重后随机放入 6 个水族箱开始正式实验, 每箱 10 尾。3 个玻璃水族箱为 3 个实验平行组, 每天从池塘捞取微囊藻 (400 × 光学显微镜下鉴定); 然后投放到实验水族箱内, 水族箱内微囊藻密度一般维持在 $1 \times 10^7 \sim 3 \times 10^7$ 个

收稿日期: 2006–11–23; 修订日期: 2007–06–25.

基金项目: 农业部农业结构调整项目 (05–08–2A); 中国水产科学研究院淡水生态与健康养殖重点开放实验室第五期开放课题。

作者简介: 姚雁鸿 (1972–), 男, 博士生, 副研究员, 从事养殖生态工程研究. E-mail: yaoyh123@gmail.com

通讯作者: 何文辉. E-mail: whhe@shfu.edu.cn

1 L。另外3个玻璃水族箱作为平行对照组(不添加任何藻类)。每天投食颗粒饲料2次(9:00, 17:00各1次)至饱食,每天21:00给玻璃水族箱清污并更换约1/5曝气自来水。各水族箱温度控制在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 并充气。正式养殖周期为42 d,为减少体质量测量对鱼生长的影响,在养殖实验周期内未对银鲫体质量进行测量,在生长实验结束后停食1天,然后称重并取样,实验期间各组均未发生银鲫死亡现象。

生长性能的观测指标为增重率,计算公式如下:

增重率 = $[(\text{平均终末质量} - \text{平均初始质量}) / \text{平均初始重}] \times 100\%$

1.2.2 消化酶测定 分离银鲫的肝胰脏和肠道,每个玻璃水族箱中所饲养银鲫的肝胰脏和肠道分别合并成1个样本,称重,匀浆,用0.125 mol/L的稀硫酸提取蛋白酶、淀粉酶,在 -4°C 冰箱中静置过夜。离心取上清液,用0.125 mol/L硫酸将沉淀再抽提2 h,离心,合并上清液^[9]。采用福林酚试剂法测定蛋白酶活性^[9]。采用淀粉-碘显色法测定淀粉酶活性^[10]。

蛋白酶活力单位定义:1 g新鲜组织样品在pH 7.6和 37°C 条件下,1 min水解酪蛋白产生1 μg 酪氨酸的酶为1个酶活单位(U)。

淀粉酶活力单位定义:1 g新鲜组织样品在pH 7.6和 30°C 条件下,30 min完全水解10 mg淀粉的酶量为1个酶活单位。

1.2.3 藻毒素测定 实验结束后取水样作毒素分析。水样处理方法参照文献[12]。

实验期间每10 d对水中微囊藻作1次毒素分

析。藻样前处理步骤参照文献[13]进行,共取样5次,每次3个重复。

试验结束后鱼样分别取肌肉和肝脏作毒素分析,每个玻璃水族箱的鱼样肌肉和肝脏分别合并成一个样本,鱼样前处理步骤参照文献[14]进行。

毒素样品前处理完后均用HPLC分析,HPLC流动相为三氟乙酸水溶液+甲醇(65%甲醇和0.02%三氟乙酸),流速为0.12 mL/min,所用色谱柱为Cosmosil 5 C₁₈-AR柱(4.6 mm $\times$ 150 mm),柱温为 25°C ,UV检测波长为238 nm。

1.3 数据分析

数据统计分析与作图均用SPSS13.0软件进行,以 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为极显著差异。

2 结果与分析

2.1 微囊藻对银鲫生长和消化酶活性的影响

微囊藻对银鲫生长的影响如表1所示,经过42 d的生长,在银鲫生长的环境水体中添加有毒微囊藻的实验组平均增重率为38.60%,而平行对照组平均增重率为87.70%,统计分析表明,实验组和平行对照组的银鲫生长有极显著差异($P < 0.01$)。微囊藻对银鲫消化酶活性的影响见图1。由图1可知,添加微囊藻组银鲫的淀粉酶和蛋白酶活性均显著低于不添加微囊藻的平行对照组($P < 0.05$),添加微囊藻组的银鲫肠、肝胰脏蛋白酶活性和肠、肝胰脏淀粉酶活性分别是对照组的60.6%、71.3%、65.4%、68.2%。

表1 有毒水华微囊藻对银鲫生长的影响(42 d)

Tab.1 Effects of toxic microcystis on the growth of *Carassius auratus* (42 d)

组别 Group	初始体质量/g Initial BW ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	终末体质量/g Final BW ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	增重率/% Weight gain rate
实验平行组1 Experimental group 1	7.00 $\pm$ 0.54	9.40 $\pm$ 0.57	34.20
实验平行组2 Experimental group 2	6.53 $\pm$ 0.62	9.52 $\pm$ 0.95	45.70
实验平行组3 Experimental group 3	6.80 $\pm$ 0.53	9.40 $\pm$ 1.01	38.20
实验组总平均 Mean of Experiment groups	6.78 $\pm$ 0.58	9.40 $\pm$ 0.92	38.60
对照平行组1 Control group 1	6.65 $\pm$ 0.56	12.46 $\pm$ 0.73	87.30
对照平行组2 Control group 2	6.69 $\pm$ 0.61	12.76 $\pm$ 0.66	90.70
对照平行组3 Control group 3	6.93 $\pm$ 0.70	12.84 $\pm$ 0.84	85.30
对照组总平均 Mean of control groups	6.76 $\pm$ 0.62	12.69 $\pm$ 0.75	87.70

注:实验组添加水华微囊藻,对照组未添加水华微囊藻。

Note: Toxic *Microcystis* had been introduced in the experimental groups and no toxic *microcystis* in the control groups.

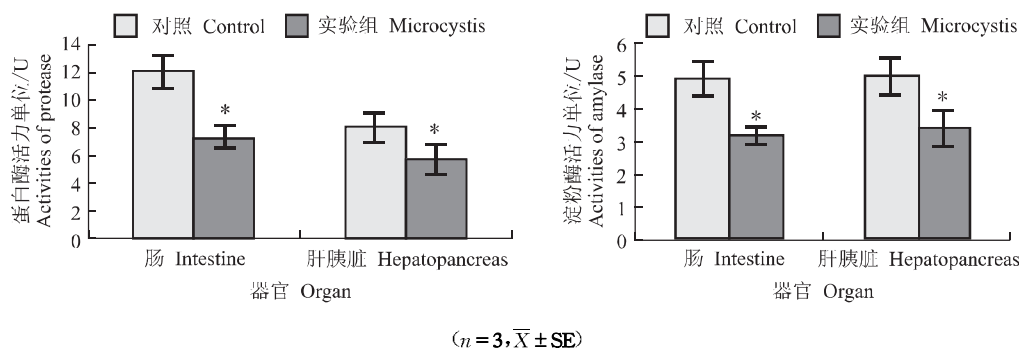


图1 有毒水华微囊藻对银鲫肠和肝胰脏消化酶活性的影响

注:图示肝胰脏蛋白酶活性为实际值的10倍。

Fig.1 The effects of toxic *Microcystis* on activities of digestive enzymes in the intestine and hepatopancreas of *Carassius auratus*

Note: The value of activities of protease or amylase in hepatopancreas showed in this figure is ten times of the actual value.

2.2 藻毒素在银鲫体内的积累

在整个实验期间,实验组添加的微囊藻都含大量有毒微囊藻,其毒素含量见图2。经过长时间的添加有毒微囊藻,实验组银鲫生长的水环境也检测出微囊藻毒素,其值为 $0.57 \mu\text{g/L}$ (图3);对照组不含有毒微囊藻,水体也没有检测到藻毒素。而且实验结束后在实验组银鲫的肌肉和肝脏中均检测到了微囊藻毒素(Microcystin) (图3),表明环境藻毒素可以在银鲫体内积累,而且肝脏毒素积累是肌肉毒素积累的2倍多。对照组中银鲫的肌肉和肝脏中均未检测到藻毒素的存在。

3 讨论

池塘养殖主要依靠人工投饵来促进鱼类生长。投饵输入的营养只有部分被鱼类摄取,剩余部分直接进入水体,而且由于鱼类对营养成分固有的同化率导致摄入的营养相当一部分又以排泄物的形式排入水体,从而导致水体的严重富营养化。因此夏秋季的池塘极易暴发微囊藻水华,很多研究表明微囊藻水华产生的次生代谢物微囊藻毒素会对鱼类产生严重的伤害^[4-5],鱼体富集微囊藻毒素的途径主要有3种:一是直接摄食有毒微囊藻而富集藻毒素,如白鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*)、罗非鱼 (*Oreochromis*)等;二是摄食浮游动物富集微囊藻毒素,因为浮游动物摄食有毒微囊藻而富集微囊藻毒素,鱼类摄食这些浮游动物后微囊藻毒素即转移到鱼体,如鳊 (*Aristichthys nobilis*)等;三是直接从其生存的含微囊藻毒素的水环境中富集。银鲫是杂食性鱼类,自然水体中的银鲫以微囊藻为主要食物,微

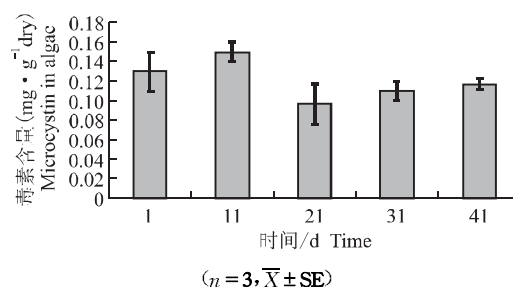


图2 微囊藻中藻毒素含量

Fig.2 Microcystin concentrations in microcystis cells

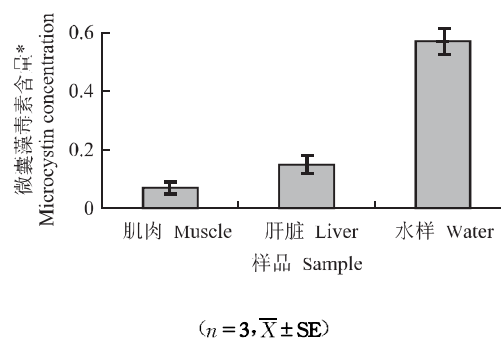


图3 水样和银鲫组织中藻毒素含量

*:肌肉和肝脏的毒素含量单位为 $\mu\text{g/g}$ 干质量,水样的毒素浓度单位为 $\mu\text{g/L}$ 。Fig.3 Microcystin concentrations in water samples and tissues of *Carassius auratus**: The unit of microcystin concentration in muscle and liver of *Carassius auratus* is $\mu\text{g/g}$ dry weight; the unit of microcystin concentration in water samples is $\mu\text{g/L}$.

囊藻可占鲫鱼食物体积的绝大部分^[14]。虽然人工养殖环境下的银鲫生长可能主要依靠摄食人工饲料获得,但如果其生存的环境中富含大量微囊藻,银鲫也会以微囊藻作为其补充食物来源。因此本研究中银鲫体内富集的微囊藻毒素可能主要来源于直接摄食有毒微囊藻和从含微囊藻毒素的水环境中富集两种途径。

饲料中添加有毒蓝藻会严重抑制鱼类的摄食和生长^[7-8]。本研究表明,长期生长在微囊藻水华环境中的银鲫的生长和消化酶活性都会明显被抑制,消化酶活性的降低也会抑制银鲫的摄食活动。消化酶活性受外界环境因子诸如温度、盐度、pH值及重金属离子影响较大,饵料也与消化酶的活性紧密相连^[15],因此本研究中鲫消化酶活性降低既可能是由于银鲫部分摄食微囊藻直接导致消化酶降低,也可能是由于积累藻毒素而导致消化器官受到损伤而引起,如 Huynh-Delerme 等就报道过藻毒素引起青鳉胚胎和幼鱼消化道损伤的研究^[16]。

淡水鱼是人类重要的食物资源,微囊藻毒素可由此途径进入人体从而引发人体潜在的健康危害,这已成为一个重要的公共卫生问题^[17],已有研究发现,在肝癌高发区水源水中微囊藻毒素含量较高,提示肝癌的发生与微囊藻毒素有关^[18]。因此必须对池塘夏秋季微囊藻水华暴发的问题引起足够的重视并探索预防和控制的办法。

参考文献:

- [1] Huisman J, Matthijs H C P, Visser P M. Harmful cyanobacteria [M]. Amsterdam: Springer, 2005: 1-25.
- [2] Sevrin-Reyssac J, Pletikosc M. Cyanobacteria in fish ponds [J]. Aquaculture, 1990, 88: 1-20.
- [3] 福迪 B(捷克). 藻类学 [M]. 罗迪安译. 上海: 上海科学技术出版社, 1980: 419-420.

- [4] 金丽娜, 徐小清. 微囊藻毒素对鱼类毒性影响的研究进展 [J]. 水生生物学报, 2003, 27(6): 644-647.
- [5] Malbrouck C, Kestemont P. Effects of microcystins on fish [J]. Environ Toxicol Chem, 2006, 25(1): 72-86.
- [6] 陈少莲, 刘肖芳, 胡传林, 等. 论鲢、鳙对微囊藻的消化利用 [J]. 水生生物学报, 1990, 14(1): 49-59.
- [7] Zhao M, Xie S, Yang Y, et al. Effect of inclusion of blue-green algae meal on growth and accumulation of microcystins in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) [J]. J Appl Ichthyol, 2006, 22: 72-78.
- [8] Bury N R. The effects of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR and ammonia on growth rate and ionic regulation of brown trout [J]. J Fish Biol, 1995, 46: 1 042-1 054.
- [9] 中山大学生物系. 生化技术导论 [M]. 北京: 人民教育出版社, 1979.
- [10] 上海市医学化验所. 临床生化检验 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [11] 王东利, 李洁, 梁亚莉, 等. 水中痕量微囊藻毒素的测定 [J]. 中国公共卫生, 2003, 19(8): 992-993.
- [12] 赵以军. 滇池蓝藻“水华”微囊藻毒素的分离和鉴定 [J]. 华中师范大学学报, 1999, 32(2): 250-254.
- [13] 徐海滨. 微囊藻毒素在鲤鱼体内生物富集作用的初步研究 [J]. 中国食品卫生杂志, 2003, 15(3): 202-204.
- [14] 刘恩生, 刘正文, 鲍传和. 太湖鲫鱼数量变化的规律及与环境关系分析 [J]. 湖泊科学, 2007, 19(3): 345-350.
- [15] 田宏杰, 庄平, 高露姣. 生态因子对鱼类消化酶活力影响的研究进展 [J]. 海洋渔业, 2006, 28(2): 158-162.
- [16] Huynh-Delerme C, Edery M, Huet H, et al. Microcystin-LR and embryo larval development of medaka fish, *Oryzias latipes*. I. Effects on the digestive tract and associated systems [J]. Toxicon, 2005, 46: 16-23.
- [17] Magalhaes V F, Soares R M, Azevedo S M. Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua? Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk [J]. Toxicon, 2001, 39: 1 077-1 085.
- [18] 俞顺章, 赵宁, 资晓林. 饮水中微囊藻毒素与我国原发性肝癌的关系的研究 [J]. 中华肿瘤杂志, 2001, 23(2): 96-99.

Effects of toxic microcystis on the growth, activities of digestive enzymes and accumulation of microcystin in *Carassius auratus*

YAO Yan-hong^{1,2}, YU Lai-ning³, HE Wen-hui⁴, LI Gu¹, LUO Xiao-song¹

(1. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China; 2. College of Fishery, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China; 3. School of Medicine and Life Science, Jiangnan University, Wuhan 430056, China; 4. College of Aqua-Life Sciences and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Two groups of aquaculture system were designed to evaluate the toxic effect of *Carassius auratus*. One was experimental group, in which the toxic *microcystis* was introduced and the density of *Microcystis* was maintained at $1 \times 10^7 - 3 \times 10^7$ ind/mL. Another was control group, in which no toxic *microcystis*

was introduced. Each group contained three replicates. Every replicate contained 10 *Carassius auratus*. The experiments were conducted in six aquaria. Experiment period was 42 d. The results demonstrated that toxic microcystis environment had significant suppressive effects on growth ($P < 0.01$) and activities of digestive enzymes ($P < 0.05$) in *Carassius auratus*. The growth gain rate of *C. auratus* of experiment groups was 38.6%, while that of control groups were 87.7%. The activities of protease in the intestine and hepatopancreas in experiment groups were 60.6% and 71.3% of those in control, respectively. Meanwhile, the activities of amylase in the intestine and hepatopancreas of experiment groups were 65.4% and 68.2% of those in control, respectively. The microcystin could accumulate in *Carassius auratus* body. The fish act as potential vectors to transfer the microcystin to people and may be a hazard to people's health. So more regard should be paid to the microcystis bloom in fish aquaculture. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (6): 969–973]

Key words: *Carassius auratus*; microcystis; growth; activities of digestive enzyme; microcystin; accumulation

Corresponding author: HE Wen-hui. E-mail: whhe@shfu.edu.cn

第二届“世界农业科学前沿论坛”通知

为扩大国内外农业科研人员、作者、审者与编者之间的学术与信息交流,促进我国农业科学研究的繁荣与发展,《中国农业科学》编委会/编辑部拟定于2007年11月30日~12月2日在北京举办第二届“世界农业科学前沿论坛”,届时将邀请国内外著名专家、学者作专题报告,内容主要为:

中国农业科学研究向世界水平进军的思路与对策;近年美国ARS的使命、研究成就与展望;近年日本农业科学技术发展成就与未来展望;近年CGIAR的成就与发展趋势;CELL办刊理念及与提高投稿命中率有关的影响因素;中国农业科学研究面临的重大使命与挑战;近年NSFC资助的生命(农业)科学优先发展领域解读;从世界农业科技专利发明趋势分析看世界农业科技前沿;通过文献计量学透视世界农业科学前沿;当今科学计量与科学评价走势;世界农业大学排行榜;被SCI收录的世界农业学术期刊影响力排名分析;美国农业与农业科研政策分析;日本农业与农业科研政策分析;世界农业未来30年;农业研究机构竞争情报研究理论与方法;农牧业各学科研究热点与展望。

会议费用与交款方式 交通、食、宿费用自理。10月20日以前注册,会务费1100元/人,现场注册1300元/人。在读研究生在10月20日以前注册,按800元/人收取;现场注册,按1000元/人收取。通过邮局或银行汇款均可。

开户银行: 中国农业银行北京北下关支行

账号: 050601040009874

户名: 中国农业科学院农业信息研究所(请务必注明“论坛注册费”)

地址: 北京中关村南大街12号《中国农业科学》编辑部(100081)

联系人: 刘锋 韩媛媛 路文如

电话/传真: 010-84897048 62191637 13521053838

E-mail: nongyikx@163.com; luwenru@mail.caas.net.cn; lwr@ChinaAgriSci.com