

斑马鱼和鲢对微囊藻毒素与孔雀石绿的行为反应

程炜轩, 梁旭方, 王 琳, 林小涛

(暨南大学生命科学技术学院, 广东 广州 510632)

摘要:鱼类行为能准确地反映环境变化,并且随着污染物浓度的变化而发生改变,因此将毒素敏感鱼类的行为作为标记,用以监测环境是可行的。用人工饲养、对环境毒素敏感的斑马鱼(*Danio rerio*)和对环境毒素有较强吸收能力的鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)作为指示生物,检测其行为对水体中微囊藻毒素(MC)和孔雀石绿(MG)的反应。结果表明,斑马鱼和鲢在2 $\mu\text{g/L}$ MC浸泡下未出现显著的行为反应,而在5 $\mu\text{g/L}$ 的MC浸泡下,斑马鱼摆尾频率在10 min后、移动速度在40 min后显著性下降;鲢的摆尾频率与移动速度均在40 min后显著性下降;0.5 mg/L MG处理下,斑马鱼未出现显著性行为变化,而鲢摆尾频率与移动速度均在35 min后显著性下降。

关键词:微囊藻毒素;孔雀石绿;斑马鱼;鲢;行为反应

中图分类号:Q503 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2009)05-0036-05

微囊藻毒素(microcystin, MC)和孔雀石绿(malachite green, MG)是目前水体中重要的环境毒素,MC广泛存在于自然水体中,而MG是水产养殖中最常用的药物。MC产自浮游性蓝藻,如微囊藻(*Microcystis* sp.)、鱼腥藻(*Anabaena* sp.)、颤藻(*Oscillatoria* sp. 或 *Planktothrix* sp.)、念珠藻(*Nostoc* sp.)、项圈藻(*Anabaenopsis* sp.)以及陆生的软管藻(*Hapalosiphon* sp.) (Geoffrey, 2000; Wayne et al, 2001)。MC作用的靶器官为肝脏,可引起水生生物肝脏坏死(Solter et al, 1998),也可在水生动物体内富集。此外,MC通过渔产品或饮水进入人体,也对人类健康构成潜在威胁,中国南方原发性肝癌的高发病率被认为与饮用水受到MC污染有关(Yoshio, 1996)。

MG为具金属光泽的结晶体,易溶于水和乙醇,水溶液呈蓝绿色。可作杀菌、驱虫剂,是药用染料中抗菌效力较强的一类,属于三苯甲烷类染料。鱼类养殖中一般用于防治水霉病、烂鳃病以及寄生虫病等。后来的许多研究发现,MG及其代谢产物无色孔雀石绿(LMG)在动物体内有明显的残留现象,其化学功能团三苯甲烷被确证具有高毒、高残留、“三致”等毒副作用(Hajee, 1997);近年来,许多国家都

将其列为水产养殖禁用药物。但由于MG显著的药效和低廉的价格,在水产养殖中仍有违规使用的情况,对水生动物和人类的健康带来极大的威胁。水生生物行为的变化往往是对水环境因子胁迫或毒害作用的一种响应(Scherer, 1992; Tembrock, 1992);并且随着污染程度的不同,其行为反应也有所不同(Paul & Simonin, 1996; Campbell et al, 2002)。因此,水生生物的行为对于非致死浓度的环境毒素有很好的指示作用。斑马鱼(*Danio rerio*)是一种常见的热带淡水鱼,体型小、世代周期短、繁殖率高、饲养管理方便,是毒理学实验最常用的实验动物;鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)在世界内陆水产鱼产量中位居榜首,是典型的滤食性鱼类,主要摄食浮游植物、浮游动物和碎屑等(Xie, 1999),对蓝藻水华也有很高的摄食强度(谢平, 2006)。近年来对水体的生物监测研究主要集中在生物群落结构和个体数量的变化上,对生物行为受到环境毒素的影响研究较少。因此,本研究通过毒物对斑马鱼和鲢行为影响的研究,为生态毒理学研究特别是环境监测应用等方面提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

斑马鱼和鲢购于广州市花地湾花鸟鱼虫市场,人工驯化至少1个月,光照周期设为白天12 h、黑夜12 h;驯化期间,每天早上9:00、晚上6:00投喂人工饲料,每天投喂量为体重的3%左右,多余残饵用虹吸法清除,水温保持在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, pH值稳定在7.0。养殖水为曝气自来水。挑取的实验鱼体长为

收稿日期:2009-03-23

基金项目:国家科技部863项目(2007AA09Z437);国家自然科学基金项目(30670367);广东省科技计划项目(2007B020701002; 2005B20301005);广东省自然科学基金项目(031886)。

通讯作者:梁旭方。E-mail: tliangxf@jnu.edu.cn

作者简介:程炜轩, 1981年生,男,广东人,博士,主要从事鱼类行为毒理学研究。E-mail: chan714@126.com

3 ~ 4 cm。

1.2 实验试剂

实验用的微囊藻毒素(MC-LR)从 ALEXIS 公司(USA)购买。孔雀石绿从广州化学试剂厂购买。

1.3 行为检测

实验缸体积为 20 cm × 20 cm × 20 cm, 实验时水深 4 cm, 以防止鱼体翻转和减少鱼上下迁移运动, 参照 Finger & Bulak (1989) 的方法, 缸四周用黑布包裹, 在底部画出 0.5 cm × 0.5 cm 的方格, 对鱼体进行定位。

从同批次鱼中随机选取体质强、无病害个体作为实验鱼, 每次取出 1 尾, 在清水中稳定 1 h 以上, 用网兜捞起迅速转移至相邻的另一缸清水中, 从放进去起, 每 5 min 用录像机记录 1 次行为指标, 记录时间为 1 min, 至 1 h 结束, 以此作为对照组。然后将同一尾鱼转移至相邻的配制好的毒液缸中, 记录时刻与记录时间与对照组相同, 以之作为处理组; 完毕后将录像回放, 记录游泳速度和每分钟摆尾次数等行为指标。移动距离的测定以鱼通过缸底画好的小方格数计算鱼游过的距离, 游泳速度以移动距离除以测定时间来计算。摆尾次数则以尾鳍到达 2 个极点计为 1 次。同一毒液、同一处理浓度用 20 尾鱼, 每尾做 1 次。

1.4 数据处理

使用会声会影 11.0 对录像进行编辑并获取行为数据。使用 SPSS 13.0 进行数据统计处理。毒液处理组与对照组间的差异用单因素方差分析进行统计处理, 齐性检验使用 Levene 检验; 毒素处理组和对照组内各时间点的数据采用 S-N-K 法检验实验可重复性, 显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

斑马鱼浸泡于 0.2 $\mu\text{g/L}$ MC-LR 中, 无论是摆尾频率和移动速度相对于对照组都无显著性差异, 而鲢摆尾频率仅在 30、35、50、55 min 后, 移动速度在 20、55 min 等不连续的时间点上有显著性下降(图 1、图 2), 图中有 * 表示该时刻毒液浸泡组与对照组间行为指标存在显著性差异($P < 0.05$)。使用 S-N-K 法检验, 斑马鱼和鲢毒素处理组与对照组组内各时间点的数据均属于同一整体($P \geq 0.05$)。

斑马鱼浸泡于 0.5 $\mu\text{g/L}$ MC-LR 中, 摆尾频率在 10 min 后、移动速度在 40 min 后, 与对照组相比有显著性下降, 而鲢摆尾频率与移动速度均在 40

min 后有显著性下降(图 3、图 4)。使用 S-N-K 法检验, 斑马鱼和鲢毒素处理组与对照组组内各时间点的数据均属于同一整体($P \geq 0.05$)。

斑马鱼浸泡于 0.5 mg/L MG 中, 无论是摆尾频率和移动速度相对于对照组都无显著性差异, 而鲢摆尾频率与移动速度均在 35 min 后有显著性下降(图 5、图 6)。使用 S-N-K 法检验, 斑马鱼和鲢毒素处理组与对照组组内各时间点的数据均属于同一整体($P \geq 0.05$)。

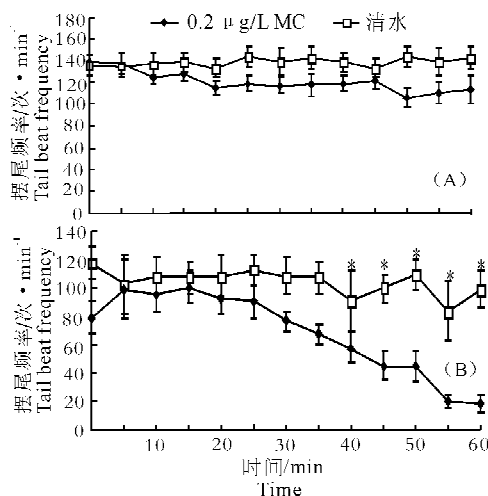


图 1 斑马鱼(A)和鲢(B)在 0.2 $\mu\text{g/L}$ MC-LR 与清水浸泡下的摆尾频率

Fig.1 Tail beat frequency of zebrafish (A) and silver carp (B) when exposed to 0.2 $\mu\text{g/L}$ MC-LR and water

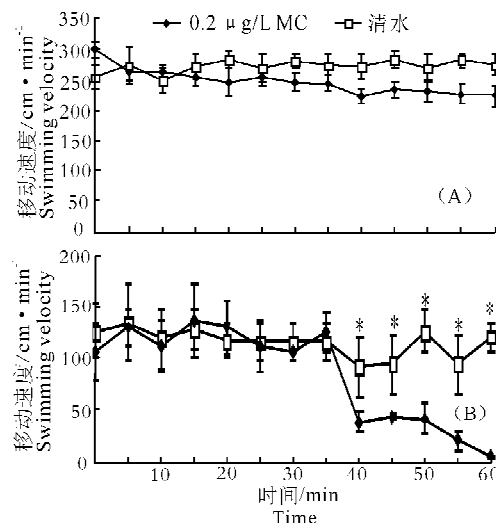


图 2 斑马鱼(A)和鲢(B)在 0.2 $\mu\text{g/L}$ MC-LR 和清水浸泡下的移动速度

Fig.2 Swimming velocity of zebrafish (A) and silver carp (B) when exposed to 0.2 $\mu\text{g/L}$ MC-LR and water significant

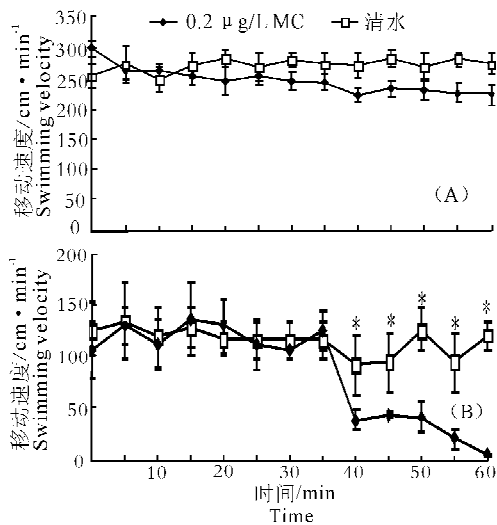


图3 斑马鱼(A)和鲢(B)在0.5 µg/L MC-LR和清水浸泡下的摆尾频率

Fig.3 Tail beat frequency of zebrafish(A) and silver carp(B) when exposed to 0.5 µg/L MC-LR and water

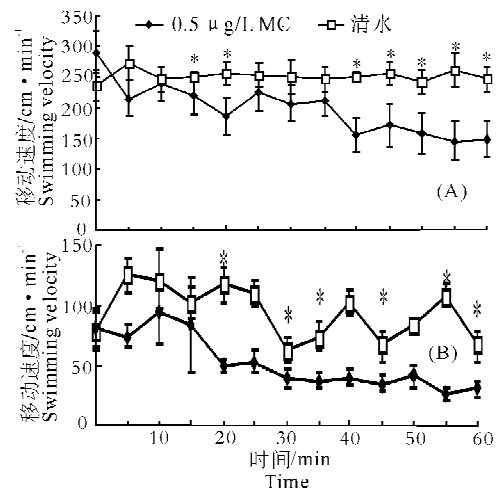


图4 斑马鱼(A)和鲢(B)在0.5 µg/L MC-LR和清水浸泡下的移动速度

Fig.4 Swimming velocity of zebrafish(A) and silver carp(B) when exposed to 0.5 µg/L MC-LR and water

3 讨论

传统方法对水环境毒素进行检测,着眼于检出毒素的种类和确切浓度,因此要确保水环境安全,需要对各种毒素进行逐项检测,工作量大,检测费用高,而且容易漏检。而本研究使用生物方法检测水环境,不在于检测有毒物质的种类和浓度,而着眼于检测水环境安全与否,通过筛选出对环境毒素敏感的小型鱼类,将其行为用作生物标记物,指示环境中有害物质的存在。将此方法用于正式检测前的粗

筛,将有效降低检测成本。实际操作中,可将2种检测方法搭配实用,从而得到最优的检测结果。

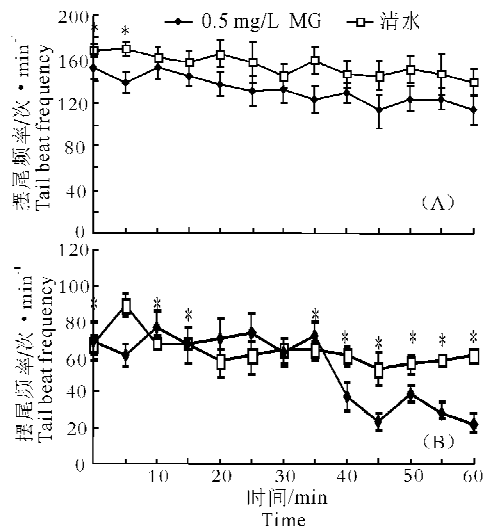


图5 斑马鱼(A)和鲢(B)在0.5 mg/L MG和清水浸泡下摆尾频率

Fig.5 Tail beat frequency of zebrafish(A) and silver carp(B) when exposed to 0.5 mg/L MG and water

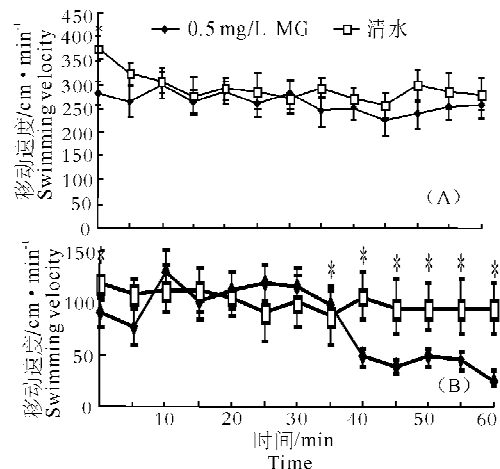


图6 斑马鱼(A)和鲢(B)在0.5 mg/L MG和清水浸泡下的移动速度

Fig.6 Swimming velocity of zebrafish(A) and silver carp(B) when exposed to 0.5 mg/L MG and water

在自然环境中,鱼类由于环境毒素胁迫,行为指标下降,从而对鱼本身产生不利影响,其结果往往是导致觅食困难或更容易被捕食(Plaut, 2000)。因此,鱼类的行为对其生理状况和动机起指示作用(Baganz et al, 2004)。本研究通过行为指标的测定,显示环境中0.2 µg/L MC-LR对斑马鱼的行为指标尚未造成显著性影响,而毒素对鲢行为指标虽然造成影响,但持续时间不稳定。当MC-LR浓度提高至0.5 µg/L时,毒素胁迫足以造成斑马鱼和鲢行为指标显著性降低。因此,斑马鱼和鲢的行为指标

对 MC-LR 的最低检测浓度 (lowest observed effect concentration, LOEC) $\leq 0.5 \mu\text{g/L}$, 这与 Baganz 等 (2004) 对斑马鱼和欧洲鲤的研究结果相类似。MG 对不同鱼类的影响也有差异, 有研究表明, 鲢在 $1\,000 \text{ mg/L}$ 的孔雀石绿中才出现显著的行为变化 (Srivastava et al, 1995); 而本研究结果显示, 0.5 mg/L MG 对斑马鱼的行为指标尚未造成显著性影响, 而对鲢行为指标造成显著性降低。

斑马鱼和鲢的摆尾频率和游泳速度等行为指标在较高浓度 MC-LR 浸泡下均有显著性下降趋势。其原因有两方面: 一方面, 鱼在排出毒素过程中增强自身代谢, 消耗大量能量, 导致能量不足; 另一方面, 大量能量用于 MC 的生物转化。有报道称, 对于鲑鱼, 微囊藻毒素经胃肠道吸入后进入肝脏和血液 (Solter et al, 1998), 而鲢吸入 MC 后, 在肝脏和肌肉中均可检出 MC, 在血液中却未能检出, 因此鲢对 MC 的生物降解非常快 (谢平, 2006)。在 MC 的生物降解过程中, GST 介导的去毒反应被认为在微囊藻去毒过程中起重要作用: 在微粒体 (microsomal) 和可溶性谷胱甘肽转移酶 (soluble glutathione S-transferases, GSTs) 作用下形成 MC 与谷胱甘肽的加合物, 并最终降解为半胱氨酸加合物 (Pflugmacher et al, 1998), 使毒素易于排出体外。

MG 的代谢途径与 MC 有区别, MG 进入机体后, 被机体迅速吸收, 在血液、肝脏、肾脏、肌肉、皮肤和其它内脏器官中都可检测其存在, 而 GST 介导的去毒反应似乎并非 MG 的主要去毒途径。有报道称, MG 与谷胱甘肽结合形成的加合物, 能降低生物去毒基因 GST 的表达, 如虹鳟在 MG 浸泡下, GST 表达量略有降低 (Lanari et al, 1996), 而且 MG 对人 α 型和 π 型 GST 均有抑制效应 (Glanville & Clark, 1997); 另外, 有研究指出, 对于虹鳟, 其肝脏和胆囊在孔雀石绿的排出过程中起主要作用 (Clifton-hadley & Alderman, 1987)。因此, 推测鱼在 MG 浸泡下, 行为指标降低与肝脏和胆囊排出毒素而消耗大量能量有关。

在 $0.5 \mu\text{g/L}$ MC 浸泡下, 鲢比斑马鱼在响应时间上更长, 可能与其对 MC 的敏感性较低有关。从进化的角度讲, 鱼类对 MC 的脆弱性可能受到其生活习性及其摄食模式的影响。鲢在肥沃的亚热带长江流域水体中分布广泛, 而这些水体常常含有大量有毒蓝藻。因此, 鲢在进化过程中, 可能发展形成了对 MC 的较强抗性 (Xie et al, 2004)。斑马鱼原产于南亚的印度和孟加拉国, 属热带季风气候, 湿热多雨,

而这种气候下, 水体中的蓝藻密度通常比亚热带的长江流域低, 因此, 斑马鱼在进化过程中对 MC 的抗性相对于鲢较弱。孔雀石绿属于人工药物, 鱼类对其抗性可能差异不大, 由于鲢属于滤食性鱼类, 因此比斑马鱼更容易将孔雀石绿吸进鳃和消化道内, 在相同浓度的 MG 浸泡下, 鲢比斑马鱼似乎更敏感。

通过鱼类行为指标对环境毒害物质的指示作用, 在使用传统方法检测前进行粗筛, 将有效降低检测成本和工作量。本研究为斑马鱼和鲢的环境监测应用提供了基础资料, 但实际应用中仍需要针对不同鱼类进行比较研究, 筛选出对毒素更敏感的鱼类, 从而提高该检测方法的精确度, 扩大其应用范围。

参考文献:

- 谢平. 2006. 水生动物体内的微囊藻毒素及其对人类健康的潜在威胁 [M]. 北京: 科学出版社: 69-71.
- Baganz D, Staaks G, Pflugmacher S, et al. 2004. Comparative Study of Microcystin-LR-Induced Behavioral Changes of Two Fish Species, *Danio rerio* and *Leucaspis delinatus* [J]. *Environmental Toxicology*, 19(6): 564-570.
- Campbell H A, Handy R D, Sims D W. 2002. Increased metabolic cost of swimming and consequent alterations to circadian activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to dietary copper [J]. *Fish Aquat Sci*, 59: 768-777.
- Clifton-hadley R S, Alderman D J. 1987. The effects of malachite green upon proliferative kidney disease [J]. *Journal of Fish Diseases*, 10: 101-107.
- Finger S E, Bulak J S. 1989. Toxicity of water from three South Carolina rivers to larval striped bass [J]. *Trans. Am. Fish Soc*, 117: 521-528.
- Geoffrey A Codd. 2000. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control [J]. *Ecological Engineering*, 16(1): 51-60.
- Glanville S D, Clark A G. 1997. Inhibition of human glutathione S-transferases by basic triphenylmethane dyes [J]. *Life Sciences*, 18: 1535-1544.
- Hajee C A J. 1997. Residues of mebendazole and malachite green in eel and trout: analytical and pharmacokinetic aspects [M]. Utrecht: Utrecht University: 183.
- Lanari D, Lang G, Ballestrazzi R. 1996. Toxic effects of malachite green on some biochemical parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) [J]. *Aquacult*, 31(2): 59-74.
- Paul E A, Simonin H A. 1996. Effects of naled, synergized, and non-synergized resmethrin on the swimming performance of young trout [J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 57: 495-502.

- Pflugmacher S, Wiegand C, Oberemm A, et al. 1998. Identification of an enzymatically – formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR. The first step of detoxication [J]. *Biochimica Acta*, 1425: 527 – 533.
- Plaut I. 2000. Effects of fin size on swimming performance, swimming behavior and routine activity of zebrafish *Danio rerio* [J]. *Exp Biol*, 203: 813 – 820.
- Scherer E. 1992. Behavioral responses as indicators of environmental alterations, approaches, results, developments [J]. *Appl Ichthyol*, 8: 122 – 131.
- Solter P F, Wollenberg G K, Huang X, et al. 1998. Prolonged sublethal exposure to the protein phosphatase inhibitor microcystin – LR results in multiple dose-dependent hepatotoxic effects [J]. *Toxicol Sci*, 44: 87 – 96.
- Srivastava S J, Singh N D, Srivastava A K, et al. 1995. Acute toxicity of malachite green and its effects on certain blood parameters of a catfish, *Heteropneustes fossilis* [J]. *Aquatic Toxicology*, 31(3): 241 – 247.
- Tembrock G. 1992. *Verhaltensbiologie (Behavioral biology)* [M]. Fischer Verlag. Germany: Rev. ed. Jena: 368.
- Wayne W Carmichael, Sandra M F O, Azevedo Ji Si An, et al. 2001. Human Fatalities from Cyanobacteria: Chemical and Biological Evidence for Cyanotoxins [J]. *Environmental Health Perspectives*, 109(7): 663 – 668.
- Xie L Q, Xie P, Ozawa K, et al. 2004. Dynamics of microcystins-LR and-RR in the phytoplanktivorous silver carp in a sub – chronic toxicity experiment [J]. *Environ. Pollu*, 127: 431 – 439.
- Xie P. 1999. Gut contents of silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* and the disruption of a centric diatom, *Cyclotella* on passage through the esophagus and intestine [J]. *Aquaculture*, 180: 295 – 305.
- Yoshio Ueno, Satoshi Nagata, Tomoaki Tsutsumi, et al. 1996. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay [J]. *Carcinogenesis*, 17(6): 1317 – 1321.

(责任编辑 万月华)

Behavior Response of Zebrafish, *Danio rerio* and Silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* to Microcystins and Malachite Green

CHENG Wei-xuan, LIANG Xu-fang, WANG Lin, LIN Xiao-tao

(College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Behavior index of fish accurately reflected the alteration of environment. In addition, it could monitor the existence of contamination and followed the concentration change of contamination, so it was feasible to use the sensitive fish to monitor the environment. This study used *Danio rerio*, which was a sensitive fish to environmental toxin and *Hypophthalmichthys molitrix*, which had strong absorbability to environmental toxin to be the eucoen, and behavior index of these two fishes was used to monitor the existence of microcystins (MC) and malachite green (MG). The results showed that, when exposed to 2 $\mu\text{g/L}$ MC-LR, no significant behavior response of *Danio rerio* and *Hypophthalmichthys molitrix* were observed. When exposed to 5 $\mu\text{g/L}$ MC-LR, tail beat frequency of *Danio rerio* and *Hypophthalmichthys molitrix* decreased significantly after 10 min and 40 min, respectively. Swimming velocity of *Danio rerio* and *Hypophthalmichthys molitrix* both decreased significantly after 40 min. When exposed to 0.5 mg/L MG, no significant behavior response of *Danio rerio* was observed, whereas tail beat frequency and swimming velocity of *Hypophthalmichthys molitrix* decreased significantly after 35 min.

Key words: Microcystin; Malachite green; Zebrafish; *Hypophthalmichthys molitrix*; Behavior response