

蒋玫, 缪宇平, 袁骥. 2009 微小亚历山大藻对黑鲷早期生长发育的毒性效应[J]. 环境科学学报, 29(10): 2152-2156

Jiang M, Miao Y P, Yuan Q. 2009 The effect of *Alexandrium minutum* on development of eggs and larvae of the fish *Sparus macrocephalus* [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 29(10): 2152-2156

微小亚历山大藻对黑鲷早期生长发育的毒性效应

蒋玫^{1*}, 缪宇平¹, 袁骥¹, 夏培艳²

1 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090

2 上海海洋大学, 上海 201306

收稿日期: 2009-02-16 修回日期: 2009-05-06 录用日期: 2009-08-10

摘要: 通过微小亚历山大藻 (*Alexandrium minutum*) 对黑鲷 (*Sparus macrocephalus*) 胚胎及仔鱼的急性和亚急性毒性的实验, 研究了微小亚历山大藻其藻细胞液和细胞破碎液对黑鲷幼体的生物毒性效应. 结果表明, 微小亚历山大藻对黑鲷胚胎的孵化产生不利影响, 影响程度随藻细胞浓度的增加而增加. 在仔鱼 96h 的急性毒性实验中, 微小亚历山大藻对仔鱼的 96h 理论半致死浓度分别为 1.0×10^5 cells mL⁻¹ (藻细胞破碎液)、 8.0×10^4 cells mL⁻¹ (藻细胞液), 而在 7d 的亚急性实验中, 高浓度藻细胞液对仔鱼的生长发育有一定的抑制作用, 且相同浓度下, 藻细胞液产生的毒性较藻细胞破碎液大.

关键词: 微小亚历山大藻; 毒素; 胚胎; 仔鱼; 毒性

文章编号: 0253-2468(2009)10-2152-05 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

The effect of *Alexandrium minutum* on development of eggs and larvae of the fish *Sparus macrocephalus*

JIANG Mei^{1*}, MIAO Yuping¹, YUAN Qi¹, XIA Peiyan²

1 East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Science, Shanghai 200090

2 Shanghai Ocean University, Shanghai 201306

Received 16 February 2009; received in revised form 6 May 2009; accepted 10 August 2009

Abstract The bio-toxicity of the dinoflagellate *Alexandrium minutum* on black seabream (*Sparus macrocephalus*) was studied by observing the acute toxicity and subacute toxicity of *A. minutum* on the *S. macrocephalus* embryo and larvae. The presence of *A. minutum* has an adverse effect on the hatching of *S. macrocephalus* embryo, and the adverse effect increased with increasing cell density. In the acute toxicity experiments, the 96h-LC₅₀ were 1.0×10^5 cells mL⁻¹ for the intact algal solution and 8.0×10^4 cells mL⁻¹ for the lysate. In a 7 day subacute experiment on the larvae, higher concentrations of algal solution inhibited *S. macrocephalus* larvae. The toxicity of the algal solution was higher than that of the lysate at the same concentration.

Keywords *Alexandrium minutum*; toxic; eggs and larvae; toxicity

1 引言 (Introduction)

赤潮藻毒素所造成的渔业生态环境的恶化, 成为制约渔业生物资源可持续利用的主要因素 (尹伊伟等, 2000). 藻毒素不仅能直接导致渔业生物的大量死亡, 也可以通过在生物体内富积, 经由食物链导致人类中毒甚至死亡, 甚至还可通过影响鱼类的幼体或生活史的其它阶段而改变海洋营养结构 (张杭君等, 2003; 谭志军等, 2002). 微小亚历山大藻作

为一种赤潮藻, 能够产生麻痹性贝类毒素 (PSP). 该毒素是一种带有胍基的三环化合物的非蛋白质毒素, 属于四氢嘌呤的衍生物 (华泽爱等, 1994). 它主要通过一类特异性钠离子阻断剂, 能阻碍动作电位的形成, 进而引起神经和肌肉组织的紊乱, 最终导致渔业生物身体机能病变及行为活动能力的失常 (White et al., 1980; 周成旭等, 2000). 以往有关赤潮藻毒素的研究大多集中于鱼类的成体和幼体阶段的毒性方面 (颜天等, 2002; 2006; U sup et al.,

基金项目: 上海市科委“登山行动计划”项目 (No. 06dz2015); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (中国水产科学研究院东海水产研究所) (No. 2007M08)

Supported by the Shanghai Science Commission Mountain Engineering Action Plan Project (No. 06dz2015) and the Special Research Fund for the National Non-profit Institutes (East China Sea Fisheries Research Institute) (No. 2007M08)

作者简介: 蒋玫 (1973-), 女, 副研究员; * 通讯作者 (责任作者), E-mail: jiangmse73@sina.com

Biography: JIANG Mei (1973-), female, associate professor. * Corresponding author. E-mail: jiangmse73@sina.com

2002 徐轶肖等, 2006 周立红等, 2003), 但对于对胚胎幼体发育阶段这一重要和敏感阶段研究却很少 (Km, 2001). 因此, 本文旨在通过研究微小亚历山大藻对黑鲷胚胎及仔鱼的生长发育的影响, 对海洋渔业生态系统的保护和赤潮灾害的评估提供参考依据.

2 实验材料与方法 (Experimental method and materials)

2.1 材料

实验黑鲷来自江苏省海洋水产研究所养殖场, 为亲鱼直接产卵和孵化的初孵仔鱼. 实验用水来源于养殖场的自然海水, 主要盐度为 22

微小亚历山大藻藻种 (AMTK-9藻株) 由台湾大学周宏农教授生物实验室提供, 并在实验室分离所得, 在实验室以 2L 三角烧瓶 f/2 培养液单种培养, 温度 (20 ± 1) °C, 光照强度为 3000 lx, 光暗比为 12h: 12h 实验选用指数生长期中期的藻细胞液, 藻细胞液经过 10000 r·min⁻¹ 离心 10min 后 (或经 20µm 筛绢过滤浓缩), 沉淀部分用海水稀释成原来藻液的体积, 即为藻细胞液. 同时将该藻液进行超声破碎后, 10000 r·min⁻¹ 离心 10min, 沉淀部分用海水重新悬浮到原来体积, 即得到藻细胞破碎液.

控制实验温度为 20.2 °C 左右, 温度变幅不超过 2.0 °C, pH 为 7~8 并保持实验用水溶解氧为饱和和溶氧的 60% 以上.

2.2 方法

2.2.1 鱼卵胚胎发育毒性实验 将藻细胞液和细胞破碎液作为母液分别与海水按一定比例混合稀释成约为 5000、3000、1000、500 cell·mL⁻¹ 的 4 个浓度组, 同时以过滤海水为对照组, 每个浓度组设 3 个平行样本. 试验在盛有 1000mL 溶液的白色搪瓷盆中进行, 收集刚进行受精的卵, 并在解剖镜下进一步选取卵膜完好透明的受精卵, 在每个盆中投入约 100 个左右, 并加以标号. 实验中实验过程中每隔 6h 取样一次, 在解剖镜下仔细观察鱼卵发育情况, 记录卵孵出仔鱼所持续的时间、孵化的数量和存活情况.

2.2.2 仔鱼 96h-LC₅₀ 的毒性实验 实验溶液浓度组设置与鱼卵毒性实验相同. 仔鱼选择由受精卵培养孵化出的初孵仔鱼 (选择在水层中游动活泼的正常仔鱼供作试验材料), 分别放置于 3000mL 的白色搪瓷盆中各约 100 尾左右, 每天换水 20%, 分别于试验开始后的 24、48、72、96h 在解剖镜下详细观察仔鱼的形态 (卵黄囊的体积、心脏跳动、外观畸形

等)、游动情况及死亡数量, 并作记录.

2.2.3 仔鱼生长的亚急性毒性实验 实验液浓度组设置与鱼卵毒性实验相同. 每个平行样投放仔鱼约 100 尾左右, 充氧气, 每天换水 1 次 (换水量 20%), 进行投饵 (轮虫) 1 次, 观测 7d 内的生长情况, 记录仔鱼生长游动情况、外观畸形以及死亡数量. 每 24h 随机抽取 3 尾, 在显微镜下测定全长、电子天平测定体重 (g 以湿重计), 并根据公式 (1) 和 (2) 计算全长日增长率 (L) 和体重日增长率 (W).

$$\text{全长日增长率: } L = \frac{\lg L_2 - \lg L_1}{0.434(t_2 - t_1)} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{体重日增长率: } W = \frac{\lg W_2 - \lg W_1}{0.434(t_2 - t_1)} \times 100\% \quad (2)$$

式中, L₁、L₂ 分别为 t₁、t₂ 时全长 (mm), t₁、t₂ 分别表示实验的时间天数, W₁、W₂ 分别为 t₁、t₂ 时的体重 (g).

2.2.4 数据处理 实验数据利用 SPSS13.0 统计分析软件计算 LC₅₀ 值和进行相应数据检验.

3 实验结果 (Results)

3.1 对鱼卵的发育影响

微小亚历山大藻对黑鲷鱼卵的孵化影响结果如图 1 所示. 由图 1a 可知, 整个孵化过程中, 高浓度

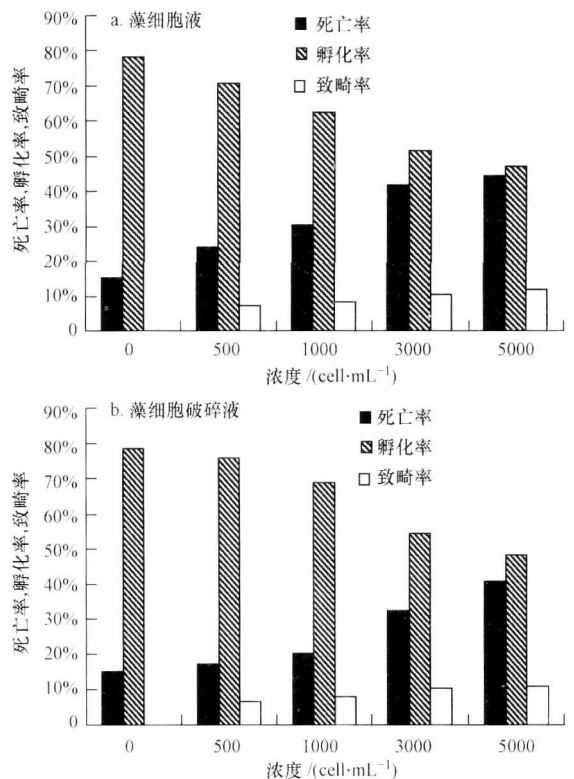


图 1 微小亚历山大藻对黑鲷鱼卵孵化的影响

Fig. 1 The subacute test of *Alexandrium minutum* on eggs of *Sparus macrocephalus*

组藻液其相应的鱼卵孵化率较低浓度组和对照组均明显要低,尤其是浓度约为 5000 cell mL^{-1} 和 3000 cell mL^{-1} 藻液的鱼卵孵化率相对于对照组 80% 的孵化率而言,明显偏低(孵化率 $< 60\%$, $p < 0.05$). 同时,高浓度组藻液引起的鱼卵的死亡率和致畸率也都随浓度的增加而逐步增大,对鱼卵胚胎的发育影响是显而易见的. 在相同藻细胞浓度下,对于细胞液和破碎液(图 1b)而言,两者对鱼卵产生死亡率的差异性较显著($p < 0.05$),细胞破碎液导致的鱼卵死亡率约占浸染细胞原液死亡率的 66%,而两者对致畸率的影响程度的差异则不显著($p > 0.1$).

3.2 仔鱼 96h-LC₅₀ 的实验

不同浓度下,藻液对仔鱼的 96h 急性毒性染毒结果如图 2 所示. 由图 2b 可知,藻细胞破碎液染毒下,仔鱼染毒 24h 除低浓度组(约 500 cell mL^{-1})和对照组未出现死亡现象外,其余各浓度均有个别死亡现象;实验进行到 48h 后,包括对照组在内的各浓度组均有不同程度死亡仔鱼出现,尤其是高浓度组(约 5000 cell mL^{-1})的死亡率最高;到 72h 后,对照组和低浓度组(约 500 cell mL^{-1})保持原有死亡率,没有再出现死鱼的现象,但高浓度组(约 5000

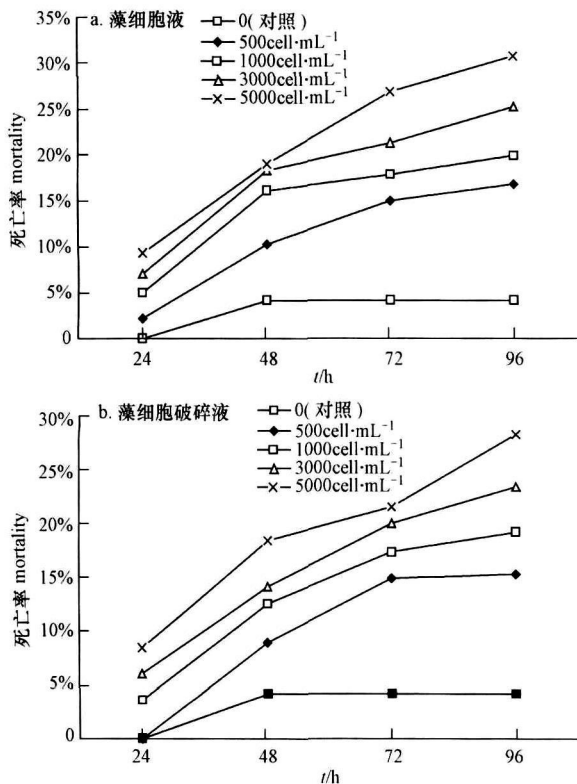


图 2 微小亚历山大藻对黑鲟仔鱼(96h内)的死亡影响

Fig. 2 The 96h-LC₅₀ test (mortality rate) of *A. macrocephalus* larvae of *Sparus macrocephalus*

cell mL^{-1}) 的死亡现象持续产生,直至 96h 实验结束. 和藻细胞破碎液相比,除 24h 低浓度藻细胞液(约 500 cell mL^{-1})产生仔鱼死亡现象外,其他各浓度组在不同时间节点产生的染毒影响均相同(图 2a). 此外,相同浓度下细胞液对仔鱼造成的死亡率较细胞破碎液要高.

根据实验结果计算得出微小亚历山大藻细胞液对黑鲟仔鱼的 LC₅₀ 约为 $8.0 \times 10^4\text{ cell mL}^{-1}$, 95% 的可信限区间约为 $2.3 \times 10^4 \sim 1.7 \times 10^6\text{ cell mL}^{-1}$. 细胞破碎液对黑鲟仔鱼的 LC₅₀ 约为 $1.0 \times 10^5\text{ cell mL}^{-1}$, 95% 的可信限区间约为 $3.4 \times 10^5 \sim 3.3 \times 10^6\text{ cell mL}^{-1}$. 由此可见,藻细胞液的毒性比细胞破碎液高一些.

3.3 仔鱼亚急性的生长发育影响实验

如图 3 所示,微小亚历山大藻的细胞液和细胞破碎液对黑鲟仔鱼的全长和体重的发育均产生一定的抑制作用. 尤其是当藻细胞浓度达到约 5000 cell mL^{-1} 时,藻细胞液和细胞破碎液下的仔鱼体重日增长率仅为 1.487 和 1.457,显著低于对照组的体重日增长率($p < 0.01$). 同样,对全长日增长率而言,在约 5000 cell mL^{-1} 浓度下的增长率明显低于对照组(0.563 和 0.564)的水平. 此外,由图 4 还可知,体重日增长率随藻浓度增加而下降的幅度明显大于全长日增长率. 由此可见,藻液对仔鱼的全长增量的抑制作用要明显低于体重的增量. 相同浓度下,藻细胞液对体重的抑制作用要大于细胞破碎液($p < 0.05$),而对全长的抑制作用,两者则相差无几($p > 0.05$).

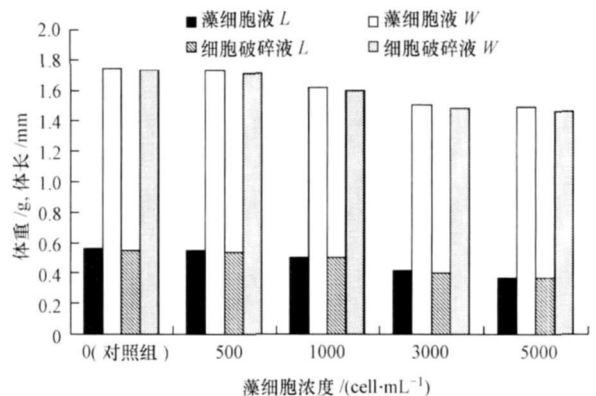


图 3 藻毒素对黑鲟仔鱼的体重全长增长的影响

Fig. 3 The effect of HAB toxin on the overall length and weight

4 讨论 (Discussion)

黑鲟鱼卵有一层卵膜,对外界干扰有保护屏障

的作用.实验结果表明,微小亚历山大藻细胞液及细胞破碎液对黑鲟鱼卵的孵化产生了一定的影响,而且随着细胞浓度的增加呈现孵化率降低,死亡率和致畸率都相应增加的趋势.这种毒性反应可能是由于藻液中的某些物质穿透卵膜,破坏胚胎组织结构,从而引起中毒的特异作用的结果.根据对海湾扇贝受精卵浸染亚历山大藻的实验(陈桃英,2007),发现亚历山大藻可以影响受精卵的细胞膜结构和胞内结构,促使大量的溶酶体产生,并使其稳定性下降.因此,微小亚历山大藻可能正是通过影响黑鲟卵胚胎的细胞结构和免疫功能而导致其孵化率的降低.

对比对照组的实验数据发现,尚未开口的黑鲟仔鱼在不同浓度的微小亚历山大藻细胞液和细胞破碎液浸染96h过程中均产生不同个体死亡的致毒影响效应.尤其是受高浓度染毒后的仔鱼,其游泳能力受到抑制,中毒症状均表现为身体失去平衡、侧转、上下乱撞乱游的现象.初孵仔鱼的个体较小,对外界的刺激反应能力较强,在严重中毒时,鱼体呈现发白状况,尾鳍末端弯曲而死亡.微小亚历山大藻会产生一种PSP的神经毒素物质,如膝沟藻毒素(GTX1-4),会阻碍钠离子通道,引起神经和肌肉组织的紊乱,从而导致机能病变、行为活动能力的失常(缪宇平等,2004).而在藻细胞液和细胞破碎液均含有该物质(陈洋等,2007).

实验结果显示,高浓度的藻细胞液和破碎液对黑鲟仔鱼的生长发育会产生较明显的抑制作用,仔鱼逐步向水面下游动,速度缓慢,但心跳依稀可见.鱼体的体重和全长的日增长率与对照组及低浓度组相比出现较明显的差异性($p < 0.05$),而且对于体重增量产生的毒性抑制作用要大于对全长增量的抑制作用.仔鱼暴露于该藻细胞液和细胞破碎液中,游泳活动力明显较差,活力的减弱势必会影响正常代谢,使得仔鱼生长发育过程受到抑制.由此可见,微小亚历山大藻对黑鲟仔鱼的生长发育和生理活动干扰作用较为明显.

此外,通过对藻细胞液和细胞破碎液两种染毒的胚胎孵化和仔鱼生长的影响情况比较发现,藻细胞液对黑鲟鱼卵和仔鱼的致毒效应要高于藻细胞破碎液.借此可以推断黑鲟早期发育阶段受微小亚历山大藻的毒性影响,其藻细胞表面产生的影响可能比藻细胞内部物质的影响更大一些.根据Km等(2001)的研究证实,藻细胞表面存在一层多糖蛋白

结构,而这种多糖蛋白在鱼卵胚胎膜和仔鱼体表的累积可能也会对鱼类的正常生理功能产生影响.因此,这种非PSP毒素物质对生物的毒害性不容忽视.

值得注意的是,一般认为,PSP中毒一般都在12~14h左右,度过此期,PSP的毒性对生物的影响会逐步减弱(刘洁生,2007).但是在7d亚急性实验进行过程中,受试的仔鱼体重和全长增长抑制影响并未表现出随时间的延续而减弱的现象,相反这种抑制作用一直保持着持续性.这种影响是藻液毒素累积效应的结果还是由于其他毒性物质的联合作用还有待进一步深入研究.

致谢:本次实验得到了周宏农教授及马继臻、黄世林、伦凤霞、陈海峰等同学的帮助以及江苏省水产研究所苗种养殖基地的大力支持,在此表示感谢.

责任作者简介:蒋玫(1973—),副研究员,主要从事海洋渔业早期生态及海洋环境评价与保护研究工作. E-mail:jiangrose73@sina.com.

参考文献(References):

- 陈桃英,颜天,刘利平,等.2007.亚历山大藻对海湾扇贝受精卵孵化的影响及致毒机制研究[J].中山大学学报,46(2):77-81
- Chen T Y, Yan T, Liu L P, et al. 2007. Impacts and toxic mechanism of dinoflagellate *Alexandrium* species on egg-hatching success of argopecten imadians lamarck [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni 46(2): 77-81 (in Chinese)
- 陈洋,颜天,谭志军,等.2007.四种/株亚历山大藻(*Alexandrium*)毒性的比较研究[J].海洋与湖泊,38(1):55-61
- Chen Y, Yan T, Tan Z J et al. 2007. Toxicity of dinoflagellate *Alexandrium* species [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica 38(1): 55-61 (in Chinese)
- 华泽爱.1994.赤潮藻类的毒素成分及其影响[J].海洋湖泊通报,(2):74-82
- Hua Z A. 1994. Toxic components in the algae associated with red tides and their effects [J]. Transactions of Oceanology and Limnology, (2): 74-82 (in Chinese)
- Km D K, Okamoto T, Oda T, et al. 2001. Possible involvement of the glycocalyx in the ichthyotoxicity of *Chattonella marina* (Raphidophyceae): Immunological approach using antiserum against cell surface structures of the flagellate Marine Biology [J]. Mar Biol 139 (4): 625-632
- 刘洁生,杨莉,杨维东,等.2007.麻痹性贝类毒素在大鼠体内的分布与累积[J].中国药理学与毒理学杂志,21(6):516-520
- Liu J S, Yang L, Yang W D, et al. 2007. Distribution and accumulation of paralytic shellfish poisoning toxins in rats [J]. Chin J Pharmacol Toxicol 21 (6): 516-520 (in Chinese)

- 缪宇平,周宏农,闻韧. 2004 膝沟藻毒素 Gonyautoxins的分离纯化 [J]. 药科学报, 39(1): 52—55
- Miao Y P, Zhou H N, Wen R. 2004. Isolation and purification of gonyautoxins from *Alexandrium minutum* Halim [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 39(1): 52—55(in Chinese)
- 谭志军,颜天,周名江. 2002 有害赤潮藻对鱼类影响的研究进展 [J]. 水产学报, 26(2): 561—568
- Tan Z J, Yan T, Zhou M J. 2002 Current status of studies on the effects of harmful algae on fish [J]. *Journal of Fisheries of China*, 26(2): 561—568(in Chinese)
- Usup G, Leaw C P, Amat A, *et al*. 2002. *Alexandrium* (Dinophyceae) species in Malaysian waters [J]. *Harmful Algae*, 1(3): 265—275
- White A W. 1980. Recurrence of kills of Atlantic herring (*Clupea harengus harengus*) caused by dinoflagellate toxins transferred through herbivorous zooplankton [J]. *Can J Fish Aquat Sci*, 37: 2262—2265
- 徐轶肖,江天久. 2006 塔玛亚历山大藻经蒙古裸腹溞至美国红鱼鱼苗的麻痹性贝类毒素传递与代谢研究 [J]. 环境科学学报, 26(8): 1331—1336
- Xu Y X, Jiang T J. 2006 Transfer and metabolism of paralytic shellfish poisoning from *Alexandrium tamarense* to *Moinanongolica* and to *Sciaenops ocellatus* [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 26(8): 1331—1336(in Chinese)
- 颜天,傅萌,王云峰,等. 2006 塔玛亚历山大藻对栉孔扇贝胚胎和早期幼虫的影响 [J]. 环境科学学报, 26(2): 241—246
- Yan T, Fu M, Wang Y F, *et al*. 2006. The effects of the dinoflagellate of *Alexandrium tamarense* on early development of *Chlamys farreri* [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 26(2): 241—246(in Chinese)
- 颜天,谭志军,于仁诚,等. 2002 塔玛亚历山大藻对鲈鱼幼鱼毒性效应研究 [J]. 环境科学学报, 22(6): 749—753
- Yan T, Tan Z J, Yu R C, *et al*. 2002. The effect of Dinoflagellate *Alexandrium tamarense* on juvenile Perch *Lateolabrax japonicus* [J]. *Acta scientiae circumstantiae*, 22(6): 749—753(in Chinese)
- 尹伊伟,王朝晖,江天久,等. 2000 海洋赤潮毒素对鱼类的危害 [J]. 海洋环境科学, 19(4): 62—65
- Yin Y W, Wang C H, Jiang T J, *et al*. 2000. Toxic effects of red tide toxins on fishes [J]. *Marine Environmental Science*, 19(4): 62—65(in Chinese)
- 张杭君,张建英. 2003 麻痹性贝毒素的毒理效应及检测技术 [J]. 海洋环境科学, 22(4): 76—80
- Zhang H J, Zhang J Y. 2003 Toxic effects of paralytic shellfish poisonings and analytical techniques [J]. *Marine Environmental Science*, 22(4): 76—80(in Chinese)
- 周成旭,严小军. 2000 赤潮生物的毒害机理与毒素生物化学研究 [J]. 海洋环境科学, 19(5): 23—26
- Zhou C X, Yan X J. 2000 Toxic mechanism of marine phytoplankton and the biochemical aspects of their toxins [J]. *Marine Environmental Science*, 19(5): 23—26(in Chinese)
- 周立红,陈学豪. 2003 塔玛亚历山大藻对罗非鱼肝及鳃组织 ATP酶活性的影响 [J]. 海洋科学, 27(12): 75—78
- Zhou L H, Chen X H. 2003. Effect of *Alexandrium tamarense* on a pase activity in the liver and gill of *tilapia mossambica* [J]. *Marine Sciences*, 27(12): 75—78(in Chinese)