

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2012.00817

饲喂不同浓度黄曲霉毒素 B₁ 饲料对异育银鲫成鱼的生长和毒素积累的影响

黄莹^{1,2} 朱晓鸣¹ 韩冬¹ 杨云霞¹ 金俊琰¹ 李海燕¹
陈毅峰^{1,3} 解绥启¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 福建农林大学动物科学学院, 福州 350002;
3. 水生生物多样性与保护重点实验室, 武汉 430072)

摘要: 以含不同浓度黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)的配合饲料饲喂异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)成鱼 56d, 研究异育银鲫成鱼[(122.3 ± 0.7) g]生长、生理反应、肝脏组织学变化、卵巢发育以及鱼体各组织中的 AFB₁ 的毒素积累状况。实验分为 5 个实验组, 不同实验组饲料中 AFB₁ 含量分别为 0、5、20、50、500 μg/kg 饲料(实测值分别为 2.59、4.12、12.39、46.23、454.07 μg/kg 饲料), 每个处理 3 个平行。在整个实验过程中各实验组均未表现出外部形态和行为异常, 各组存活率均达到 100%。各实验组异育银鲫成鱼终末体重、摄食率(FR)、特定生长率(SGR)和饲料效率(FE)均无显著差异。饲料 AFB₁ 水平对异育银鲫血清总胆固醇(TC)含量、血清谷丙转氨酶(GPT)、谷草转氨酶(GOT)和碱性磷酸酶(AKP)活性均无显著影响。各毒素组血清超氧化物歧化酶(SOD)活性与对照无显著差异。各毒素组肝脏和卵巢均未见明显的组织学病理变化。肌肉和性腺中的 AFB₁ 积累量低于 FDA 食品安全限定标准(5 μg/kg)。肝脏中的 AFB₁ 积累和饲料中的 AFB₁ 水平呈对数关系。饲喂 AFB₁ 50 μg/kg 饲料使异育银鲫成鱼肝脏 AFB₁ 积累超过安全限量标准。结果表明, 异育银鲫成鱼至少可耐受 AFB₁ 含量达 500 μg/kg 饲料(实测值: 454.07 μg/kg 饲料)56d。

关键词: 黄曲霉毒素 B₁; 异育银鲫; 生长; 毒素积累

中图分类号: S965.117 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2012)05-0817-09

黄曲霉毒素是一类具有相似结构的衍生物, 具有 1 个糖酸咪喃和 1 个氧杂萘邻酮(香豆素)结构。在饲料原料中最常见的有黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)、黄曲霉毒素 B₂(AFB₂)、黄曲霉毒素 G₁(AFG₁)和黄曲霉毒素 G₂(AFG₂)^[1]。其中 AFB₁ 检出率高, 强致癌性, 不仅会抑制动物免疫机能^[2], 降低生长性能^[3], 还会造成对生殖功能的损害^[4]。高浓度的 AFB₁ 会导致鱼类发病死亡, 低浓度时可使鱼类摄食和生长受到抑制, 引发肝癌。但是, 不同鱼类对 AFB₁ 的敏感性不同。El-Banna, *et al.*^[5]报道尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)采食含有 100 μg/kg AFB₁ 的饲料 10W 后生

长性能受到了抑制, 而 200 μg/kg 组的死亡率高达 16.7%。Schoenhard, *et al.*^[6]报道虹鳟(*Salmo gairdneri*)采食 0.02 mg/kg AFB₁ 的饲料 8M 后 58% 肝脏受损。Jantrarotai 和 Lovell^[7]的研究表明, 饲喂沟鲈(*Ictalurus punctatus*)含 2.15 mg/kg AFB₁ 不影响生长, 10 mg/kg 生长率降低 24%, 不发生肝癌。

受 AFB₁ 污染的食物或饲料进入鱼体内后, AFB₁ 及其代谢物会残留在鱼体组织中, 从而通过食物链对更多的物种产生影响。El-Sayed, *et al.*^[8]对海鲈(*Dicentrarchus labrax* L.)饲喂含 18 μg/kg AFB₁ 饲料 42d 后海鲈肌肉中的黄曲霉含量达到 4.25 μg/kg。

收稿日期: 2011-04-02; 修订日期: 2012-03-19

基金项目: 公益性行业(农业)专项“水产养殖动物营养需求与高效配合饲料开发 201003020”;“饲料高效低耗加工技术研究与示范 201203015”; 现代农业产业技术体系建设专项资金资助(CARS-46-19); 中国科学院知识创新工程青年人才领域前沿项目资助

作者简介: 黄莹(1982—), 女, 福建福州人; 博士研究生; 研究方向为鱼类营养与毒理。E-mail: Huangying19822@sina.com

通讯作者: 朱晓鸣, E-mail: xmzhu@ihb.ac.cn

Wu^[9]发现, 沟鲶连续 3d 采食含有 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFB₁ 的饲料后就能在其肌肉中检测出 2.2—3.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFB₁; 采食含有 50000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFB₁ 的饲料 3d 后, 肌肉中的 AFB₁ 检测值达到 7.6—27.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (9 尾鱼), 7d 后的检测值为 8.9—25.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。因而, 饲料黄曲霉毒素污染, 尤其是 AFB₁ 污染, 不仅会导致养殖鱼类死亡造成经济损失, 更会对人类的健康和生命安全构成威胁。FDA(2007)^[10]规定食品和饲料中 AFB₁ 的安全限量分别为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

异育银鲫为我国淡水养殖的重要品种, 鲫养殖的主要品系。韩冬等^[11]已经报道了饲喂低剂量黄曲霉毒素(AFB₁<30 $\mu\text{g}/\text{kg}$)对异育银鲫幼鱼的影响, 但是在我国南方地区饲料黄曲霉 AFB₁ 的最高检出量可达 239.97 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[12], 因此有必要研究高剂量 AFB₁ 对异育银鲫的影响。本论文采用异育银鲫成鱼为实验对象, 着重研究高剂量 AFB₁ 对异育银鲫成鱼的生长、生理、组织损伤和可食用部分毒素积累的影响, 进而评估水产饲料中的 AFB₁ 对水产养殖和食品安全的潜在隐患。

1 材料与方 法

1.1 养殖系统

生长实验在 15 个长方形透明玻璃缸(58 cm×46

cm×46 cm, 每缸水体积为 100 L)组成的流水养殖系统进行, 水流速度 12 L/h。每天测一次水温, 每星期检测水体溶氧和氨氮。实验期间, 水温范围为 19—23℃; 饲养用水为经曝气过的自来水, 水体中溶氧保持在 6 mg/L 以上, 氨氮在 0.4 mg/L 以下, pH 为 6.8。光照周期 12L/12D, 光亮周期为 9:00 到 21:00。

1.2 实验饲料和实验设计

实验设计 5 种等氮等能(38.01%蛋白质, 17.02 kJ/g 能量)的配合饲料, 以红鱼粉为饲料蛋白源, 蛋白含量设计为异育银鲫最适蛋白水平 38%^[13]。基础饲料配方(表 1), 添加 AFB₁ 配制成 5 种不同黄曲霉毒素浓度梯度的实验饲料, 设计毒素含量分别为 0、5、20、50、500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 饲料干物质, 各实验饲料中 AFB₁ 的实测值分别为: 2.59、4.12、12.39、46.23、454.07 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 饲料干物质。毒素梯度的设计参考已有的 AFB₁ 有关报道^[7, 11, 14]。添加的 AFB₁ 购自美国 sigma 公司, 首先溶于大豆油配制成浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的母液, 然后按照设计值添加相应量到基础饲料中。饲料原料过 40 目筛混匀, 压粒制成直径 5 mm 颗粒 60℃烘干后置于冰箱备用。

1.3 实验鱼与饲养实验

异育银鲫为中国科学院水生生物研究所关桥渔场的 1 龄鱼。实验鱼在室内循环水养殖系统的 2000

表 1 实验基础饲料配方及化学组成(%干物质)

Tab. 1 Diet formulation and chemical composition of experimental diets (% in dry matter)

原料 Ingredient	含量 Content (%)
红鱼粉(武汉福龙公司)Red fish meal (Fulong company, Wuhan)	57.00
玉米淀粉 Corn starch	25.00
大豆油 Soybean oil	4.00
¹ 维生素预混物 Vitamin premix	0.44
氯化胆碱 Choline chloride	0.11
² 矿物盐预混物 Mineral premix	5.00
纤维素 Cellulose	4.45
海藻酸钠 Sodium alginate	1.00
羧甲基纤维素 Carboxymethyl cellulose	2.00
三氧化二铬 Cr ₂ O ₃	1.00
饲料化学成分 Chemical composition (% in dry matter)	
粗蛋白 Crude protein	38.01
粗脂肪 Crude lipid	9.41
能量 Gross energy(kJ/g in dry matter)	17.02

注: 1. 维生素预混物 (mg/kg diet, NRC, 1993): 硫胺素, 20; 核黄素, 20; 维生素 B₆, 20; 维生素 B₁₂, 2; 叶酸, 5; 泛酸钙, 50; 肌醇, 100; 烟酸, 100; 生物素, 5; 淀粉, 3226; 维生素 A (ROVIMIX A-1000), 110; 维生素 D₃, 20; 维生素 E, 100; 维生素 K₃, 10; 2. 矿物盐预混物矿物盐预混物 (mg/kg diet, H440): NaCl, 500; MgSO₄·7H₂O, 7500; NaH₂PO₄·2H₂O, 12500; KH₂PO₄, 16000; Ca(H₂PO₄)₂·H₂O, 10000; FeSO₄, 1250; C₆H₁₀CaO₆·5H₂O, 1750; ZnSO₄·7H₂O, 176.5; MnSO₄·4H₂O, 81; CuSO₄·5H₂O, 15.5; CoSO₄·6H₂O, 0.5; KI, 1.5; 淀粉, 225

Note: 1. Vitamin premix (mg/kg diet, NRC, 1993): thiamin, 20; riboflavin, 20; pyridoxine, 20; cyanocobalamin, 2; folic acid, 5; calcium pantothenate, 50; inositol, 100; niacin, 100; biotin, 5; starch, 3226; vitamin A (ROVIMIX A-1000), 110; vitamin D₃, 20; vitamin E, 100; vitamin K₃, 10; 2. Mineral premix (mg/kg diet, H440): NaCl, 500; MgSO₄·7H₂O, 7500; NaH₂PO₄·2H₂O, 12500; KH₂PO₄, 16000; Ca(H₂PO₄)₂·H₂O, 10000; FeSO₄, 1250; C₆H₁₀CaO₆·5H₂O, 1750; ZnSO₄·7H₂O, 176.5; MnSO₄·4H₂O, 81; CuSO₄·5H₂O, 15.5; CoSO₄·6H₂O, 0.5; KI, 1.5; starch, 225

L 的圆形大缸(直径 150 cm×120 cm)中暂养 1 个月后将转入实验系统驯养 2W, 暂养期间投喂实验对照组饲料(配方见表 1)。实验开始时, 实验鱼饥饿 24h, 选择体质健康、规格均匀的个体(平均体重为 122.3 g)随机放入 15 个鱼缸中, 每缸 6 尾, 开始正式实验。实验鱼随机分为 5 个实验组, 每组 3 个平行, 各实验组分别对应投喂 1 组饲料(饲料 1—5)。暂养期间和实验期间, 每天分别于 9:30 和 16:00 连续投喂饲料达到表观饱食(少量多次的循环投喂, 不留残饵或极少残饵), 1W 投喂 7d, 实验持续 56d。实验结束时, 将实验鱼饥饿 1d 后称每缸鱼的体重, 记录终末体重。

1.4 实验取样

实验结束时, 每缸随机取 5 尾鱼用 MS-222 (Sigma, 美国)麻醉后静脉抽血, 每尾血样分别暂存于 1.5 mL 离心管中, 室温静置数小时后 3000 r/min 离心 15min 获得血清样, 同一缸的血清样集中, 混合均匀, 分装于 3 个 0.5 mL 离心管, 保存于 4℃ 待用(用于测定血清总胆固醇、谷丙转氨酶、谷草转氨酶、碱性磷酸酶、超氧化物歧化酶活性, 血清样在 2d 内测定)。5 尾抽过血的鱼在冰盘上解剖出肝胰脏, 其中 2 尾鱼的部分肝胰脏和性腺(均为卵巢)用波恩试剂固定用做组织切片; 剩余所有肝胰脏和性腺冷冻干燥后用做毒素残留分析。另外, 将取过肝胰脏和性腺的 5 尾鱼解剖取背部白肌, 冷冻干燥后用做肌肉毒素残留测定。

1.5 样品的制备和测定

实验饲料的干物质、粗蛋白、粗脂肪、灰分的测定参照文献[15]的方法进行测定: 干物质在 105℃ 烘干至恒重, 通过失重法测定; 粗蛋白采用 FOSS 定氮仪(2300 Kjeltac Analyzer Unit)测定; 粗脂肪采用索氏抽提仪(Soxtec system HT6, Tecator, Hoganas, Sweden)进行测定; 灰分在马福炉中 550℃ 燃烧 3h, 失重法测定。

血清总胆固醇(TC)采用上海名典生物工程有限公司研制的测试盒。血清谷丙转氨酶(GPT)、谷草转氨酶(GOT)、碱性磷酸酶(GOT)、超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定均采用南京建成生物工程研究所研制的测试盒。用 ELISA 法测定实验饲料和鱼体各组织毒素残留, 采用北京百灵康源生物公司的测试盒。

取异育银鲫肝胰脏、肌肉、性腺冷冻干燥。干燥后的各组织样和饲料均研磨成粉末。饲料和鱼体中的 AFB₁ 的提取方法如下: 取 5 g 样品置于 125 mL

带塞锥形瓶中, 加入 40 mL 甲醇水溶液(55:45)和 15 mL 石油醚(沸程为 60—90℃), 加塞水封后 150 r/min 振荡 30min, 并用快速滤纸过滤。准确移取 25 mL 上述的下层液体于 125 mL 分液漏斗中, 加入 25 mL CHCl₃, 振荡 2min, 静置分层(如有乳化现象可加少量甲醇促分层), 放出 CHCl₃ 层, 然后再次加入 5 mL CHCl₃ 于分液漏斗中, 重复振荡提取, 并将两次提取的 CHCl₃ 层一并滤于蒸发皿中, 并将蒸发皿放入通风橱并加以 65℃ 水浴蒸干。分三次准确加入 2.0 mL (0.8、0.7、0.5 mL)的 20% 甲醇-PBS(20:80)将凝结物充分溶解后, 移至 5 mL 试管中充分振荡, 即可得到 AFB₁ 提取液, 4℃ 保存。

1.6 数据处理

特定生长率(SGR)、摄食率(FR)、饲料效率(FE)等分别用以下公式计算:

$$SGR (\%/d) = 100 \times (\ln W_2 - \ln W_1) / t,$$

$$FR (\%BW/d) = 100 \times I / [(W_1 + W_2) / 2] / t,$$

$$FE (\%) = 100 \times (W_2 - W_1) / I,$$

其中, W_1 、 W_2 分别为平均初始体重和平均末重; t 为实验天数; I 为摄食量。实验数据采用统计软件 Statistica 6.0 进行统计分析。实验结果经过一元方差分析(One-way ANOVA)后, 用 Duncan's 进行多重比较, 比较各实验处理间差异的显著性, 显著性水平为 0.05。并采用二次多项式回归法分析各评价肝胰脏 AFB₁ 积累和饲料中黄曲霉毒素浓度的关系。

2 结果

2.1 饲料 AFB₁ 水平对异育银鲫成鱼生长、摄食和饲料利用的影响

在整个实验过程中, 各毒素组均未表现出外部形态和行为异常, 各组存活率均达到 100%。鱼体解剖发现, 皮肤和各组织完整, 未观察到肝脏、胆、肾脏、鳍、肠道形态的改变。如表 2 所示, 在实验结束时各实验组异育银鲫成鱼终末体重无显著差异 ($P > 0.05$)。饲料 AFB₁ 水平对异育银鲫成鱼 FR 无显著影响 ($P > 0.05$)。随着饲料 AFB₁ 水平的升高, 异育银鲫成鱼 SGR 和 FE 呈现上升的趋势, 但各毒素组与对照组间无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.2 饲料 AFB₁ 水平对异育银鲫成鱼生理指标的影响

表 3 表示实验结束时 AFB₁ 对各实验组血清总胆固醇含量、血清谷丙转氨酶、谷草转氨酶、碱性磷酸酶和超氧化物歧化酶活性的影响。饲料 AFB₁ 水平

对异育银鲫血清总胆固醇含量、血清谷丙转氨酶、谷草转氨酶和碱性磷酸酶活性均无显著影响($P>0.05$)。50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组超氧化物歧化酶活性显著高于 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组($P<0.05$)，各毒素组与对照组无显著差异($P>0.05$)。

2.3 饲料 AFB₁ 水平对异育银鲫成鱼肝脏和卵巢组织学的影响

经 56d 的含 AFB₁ 饲料投喂实验后，各实验组的肝脏外观正常，未见纤维化的现象。如图版 所示，肝细胞细胞质均匀、清晰；细胞核形状较为规则；细胞间连接致密。未见炎症细胞和嗜酸性颗粒聚集，无胆汁淤积现象。

各实验组卵巢为淡黄色，左右卵巢发育扩大相互衔接，几乎充满整个体腔。卵母细胞圆形饱满，细

胞质中出现卵黄颗粒，发展到成熟期。未有明显的病理变化(图版)。

2.4 饲料 AFB₁ 水平对异育银鲫成鱼肝胰脏、肌肉、性腺 AFB₁ 积累的影响

实验结束时异育银鲫肝胰脏、肌肉、性腺 AFB₁ 积累(表 4)。肝胰脏 AFB₁ 积累随着饲料中 AFB₁ 水平的增加而增加 ($P<0.05$)，两者呈对数关系(图 1)；摄食 AFB₁ 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的异育银鲫肝胰脏 AFB₁ 积累 $>5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。各实验组肌肉中 AFB₁ 积累均 $<0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，各组之间无显著差异($P>0.05$)。各毒素组性腺 AFB₁ 积累均 $<5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ；摄食 AFB₁ 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的异育银鲫性腺 AFB₁ 积累显著高于对照($P<0.05$)，其他各组与对照无显著差异($P>0.05$)。

表 2 各实验组异育银鲫初始体重、终末体重、摄食率(FR)、特定生长率(SGR)和饲料效率(FE)(平均值 \pm 标准误)
Tab. 2 Initial body weight, final body weight, feeding rate (FR), specific growth rate (SGR), feed efficiency (FE) of gibel carp (mean \pm SE)

饲料 AFB ₁ 添加量 Supplemented AFB ₁ ($\mu\text{g}/\text{kg}$ diet)	初始体重 Initial body weight (g)	终末体重 Final body weight (g)	摄食率 FR (%BW/d)	特定生长率 SGR (%/d)	饲料效率 FE (%)
0	123.6 \pm 0.3	153.2 \pm 3.5	1.32 \pm 0.01	0.40 \pm 0.04	31.38 \pm 2.81
5	123.5 \pm 0.6	155.1 \pm 1.7	1.34 \pm 0.01	0.42 \pm 0.03	32.68 \pm 2.11
20	123.6 \pm 0.7	155.3 \pm 1.0	1.34 \pm 0.04	0.42 \pm 0.02	32.69 \pm 1.02
50	123.7 \pm 0.6	156.5 \pm 0.9	1.32 \pm 0.00	0.44 \pm 0.02	34.19 \pm 1.49
500	123.4 \pm 0.2	158.2 \pm 2.6	1.33 \pm 0.02	0.46 \pm 0.03	35.76 \pm 2.40

注：同列数据后面英文字母不同者表示各组之间差异显著 ($P<0.05$)；下同

Note: Different superscript letters within each column represent significant differences ($P < 0.05$); the same below

表 3 饲料 AFB₁ 水平对异育银鲫血清胆固醇(TC)含量、谷丙转氨酶(GPT)、谷草转氨酶(GOT)和碱性磷酸酶(AKP)、超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响(平均值 \pm 标准误)

Tab. 3 Effect of dietary AFB₁ on serum total cholesterol (TC), activities of glutamic-pyruvic transaminase (GPT), glutamic-oxalacetic transaminase (GOT), alkaline phosphatase (AKP), superoxide dismutase (SOD) of gibel carp (mean \pm SE)

饲料 AFB ₁ 添加量 Supplemented AFB ₁ ($\mu\text{g}/\text{kg}$ diet)	血清 TC mg/dl	血清 GPT U/mL	血清 GOT U/mL	血清 AKP 金氏单位/dl	血清 SOD U/mL
0	480 \pm 37	13.6 \pm 1.0	35.1 \pm 6.9	4.26 \pm 0.28	206.1 \pm 7.5 ^{ab}
5	503 \pm 38	11.8 \pm 0.3	33.8 \pm 4.2	4.52 \pm 0.71	201.6 \pm 10.3 ^{ab}
20	454 \pm 23	13.1 \pm 1.3	41.0 \pm 6.8	4.73 \pm 0.97	202.1 \pm 14.8 ^{ab}
50	534 \pm 24	12.4 \pm 0.7	43.9 \pm 1.7	4.77 \pm 0.65	223.1 \pm 6.4 ^b
500	473 \pm 27	12.4 \pm 0.3	37.4 \pm 3.6	4.70 \pm 0.44	186.9 \pm 3.6 ^a

表 4 饲料中 AFB₁ 水平对异育银鲫肝胰脏、肌肉、性腺 AFB₁ 积累($\mu\text{g}/\text{kg}$ 湿重)的影响(平均值 \pm 标准误)

Tab. 4 Effect of dietary AFB₁ on AFB₁ accumulation ($\mu\text{g}/\text{kg}$ wet weight) in hepatopancreas, muscle and gonad of gibel carp (mean \pm SE)

饲料 AFB ₁ 添加量 Supplemented AFB ₁ ($\mu\text{g}/\text{kg}$ diet)	肝脏 AFB ₁ 积累 AFB ₁ accumulation in hepatopancreas	肌肉 AFB ₁ 积累 AFB ₁ accumulation in muscle	性腺 AFB ₁ 积累 AFB ₁ accumulation in gonad
0	1.10 \pm 0.50 ^a	0.46 \pm 0.00	1.48 \pm 0.38 ^a
5	1.86 \pm 0.05 ^{ab}	0.32 \pm 0.08	1.75 \pm 0.08 ^{ab}
20	3.11 \pm 0.70 ^b	0.32 \pm 0.09	2.03 \pm 0.02 ^{ab}
50	5.03 \pm 0.16 ^c	0.29 \pm 0.03	2.20 \pm 0.10 ^b
500	5.74 \pm 0.34 ^c	0.46 \pm 0.01	2.29 \pm 0.06 ^b

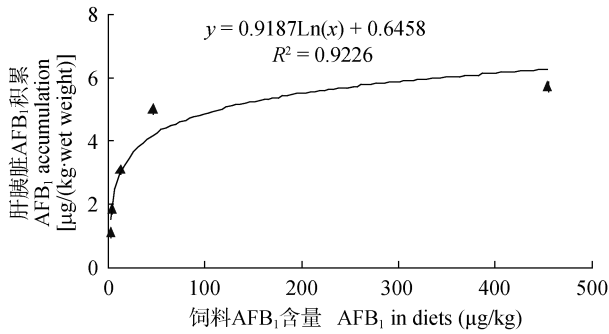


图 1 实验结束时异育银鲫肝胰脏 AFB₁ 积累(µg/kg 湿重)和饲料中 AFB₁(µg/kg)的关系

Fig. 1 Relationship between AFB₁ accumulation in hepatopancreas (µg/kg wet weight) and AFB₁ in diets (µg/kg) at the end of the experiment

3 讨论

Santacroce, *et al.*^[16]认为 AFB₁ 会导致大部分水生动物体表黄化、体重减轻、行为异常等。在本实验中各毒素组未出现行为异常和死亡情况,表明异育银鲫成鱼对 AFB₁ 有较高的耐受性。Chávez-Sánchez, *et al.*^[17]发现摄食 AFB₁ 含量达 30 mg/kg 不会引起罗非鱼死亡。Deng, *et al.*^[18]报道了摄食 AFB₁ 1641 µg/kg 20W 对罗非鱼死亡率无影响。但是,虹鳟摄食经黄曲霉毒素污染后的饲料会引发肝癌,死亡率达 85% 以上^[19]。这些不同的结果证实了 Ngethe, *et al.*^[19]提出的推断: AFB₁ 在不同种类的肝脏中的代谢机制不同。不同的鱼类在 AFB₁ 的耐受性上差别很大,其中冷水性鱼类比温水性鱼类敏感得多^[6, 7, 9, 14, 20]。

Deng, *et al.*^[18]发现罗非鱼的摄食率和饲料中 AFB₁ 存在剂量效应,摄食率随饲料中 AFB₁ 含量的升高而降低。Manning, *et al.*^[21]发现摄食黄曲霉毒素 12W 对沟鲶摄食、生长和饲料效率无显著影响。在本实验中,异育银鲫成鱼摄食含 AFB₁500 µg/kg 饲料未见摄食和饲料效率降低,此结果与 Han, *et al.*^[11]对异育银鲫幼鱼的报道相似。

肝脏被认为是黄曲霉毒素的主要作用器官。被吸收的 AFB₁ 进入机体后需经体内 I 相代谢酶(主要是细胞色素 P450 氧化酶 CYP450 家族成员代谢转化为 aflatoxin M₁ (AFM₁), aflatoxin P₁ (AFP₁), aflatoxin Q₁ (AFQ₁) 和黄曲霉毒素醇等: 黄曲霉毒素醇又可以被氧化最终致癌物,即 AFB₁-8, 9-环氧化物 (AFB₁-8, 9-epoxide, AFBO)^[22], 从而导致肝功能受损,诱发肝癌。肝功能紊乱使蛋白合成和脂肪代谢受到抑

制,从而造成血清总蛋白和总胆固醇降低^[23]。谷丙转氨酶和谷草转氨酶主要存在于肝细胞胞浆内,当肝细胞受损时细胞膜通透性增大即可逸出细胞外,而使血液中两者活性增高,是肝功能受损害最灵敏的指标。碱性磷酸酶主要用于阻塞性黄疸、原发性肝癌、继发性肝癌、胆汁淤积性肝炎等的检查。Santacroce, *et al.*^[16]认为 AFB₁ 不但会引起肝脏机能紊乱,甚至会出现组织学病变,表现为肝脏水肿,肝脏细胞受损,空泡化严重,炎症细胞增多。在本实验中, AFB₁ 对异育银鲫成鱼的血清总胆固醇、谷丙转氨酶、谷草转氨酶和碱性磷酸酶活性均未造成显著影响,说明异育银鲫成鱼摄食 AFB₁ 含量 500 µg/kg 饲料 56d 未造成肝功能受损。另外,肝脏切片结果也表明异育银鲫的肝脏未出现肝脏组织学病变。此结果与以往的大部分研究结果不同^[3, 11, 18],推测是由于不同种类对 AFB₁ 的代谢机制不同从而使其对 AFB₁ 耐受性不同。

需氧生物细胞内有一套抗氧化的防御系统,这个系统能在一定范围内保护细胞免受自由基的损伤。超氧化物歧化酶是主要的抗氧化酶之一,它的含量和活性会影响机体内活性氧自由基的水平以及脂质过氧化终末代谢产物丙二醛(MDA)的含量。抗氧化酶活力下降提示肝脏清除自由基的能力减弱。史莹华等^[24]报道猪在摄食黄曲霉毒素后,机体血清 SOD 活性均显著降低,而血清和肝脏脂质过氧化产物 MDA 的含量均显著增加,说明给猪长期饲喂 0.1 mg/kg 的黄曲霉毒素大大降低了机体的抗氧化能力。Rastogi, *et al.*^[25]报道小鼠(*Rattus norvegicus*)腹腔注射 2 mg AFB₁/kg 体重后 SOD 活性降低。这些结果与本研究的结论不同,在本研究中 AFB₁ 未造成异育银鲫成鱼 SOD 活性降低,可能是由于种类不同和毒素摄入途径不同所引起。

Coppock, *et al.*^[26]报道了黄曲霉毒素中毒会造成卵巢畸形,产弱仔,产仔量下降。Egbunike^[27]认为 AFB₁ 直接作用输精管从而使精子产量降低。在本实验中,各实验组异育银鲫成鱼卵巢均发展到成熟期,摄食 AFB₁ 达 500 µg/kg 饲料 56d 对异育银鲫成鱼卵巢发育无显著影响。

在禽类和哺乳类中已有较多关于 AFB₁ 积累的报道^[29-31],但在水产动物中的研究较少。在本实验中, AFB₁ 在异育银鲫成鱼肝胰脏的积累与剂量呈正相关的关系,高剂量组肝脏有着更多的 AFB₁ 积累,

这是因为肝胆系统被作为 AFB₁ 及其代谢物积累和排泄的理想场所^[32]。虽然 AFB₁ 在异育银鲫成鱼肝胰脏中的积累较高,但在肌肉中的积累非常低,与剂量无显著关系。此结果与 Chen, *et al.*^[33]的报道相似,鸡仔连续采食含 3380 μg/kg 黄曲霉毒素的日粮 35d 后,肝脏中的黄曲霉毒素残留量则达到 2.6 μg/kg,腿肉中有 0.11 μg/kg,而在胸肉中则仅有 0.09 μg/kg 的残留。Deng, *et al.*^[18]发现罗非鱼在摄食 AFB₁ 1641 μg/kg 15W 后肝脏中的积累可达到 24 μg/kg,而在肌肉中未检测出残留。正如 Plakas, *et al.*^[34]描述, AFB₁ 与其代谢物在沟鲶的组织中被迅速地排出,因而肌肉上的残留微乎其微。Oliveira, *et al.*^[35]在饲料中添加 0、100、300、500 μg/kg AFB₁, 结果 500 μg/kg 添加组鸡蛋中检测出含有 AFB₁ 残留物,其水平在 0.05—0.16 μg/kg 之间,平均值为 0.10 μg/kg, AFB₁ 从饲料中转移蛋中比率大约为 5000⁻¹,表明日粮中较高水平 AFB₁ 会在蛋中残留。在本实验中,异育银鲫成鱼采食含 AFB₁ 500 μg/kg 饲料长达 56d 后,肌肉和性腺中 AFB₁ 积累量分别达到 0.46 μg/kg 和 2.29 μg/kg, AFB₁ 从饲料中转移到肌肉和性腺中的比率分别约为 1086⁻¹ 和 218⁻¹。虽然肌肉和性腺中 AFB₁ 积累量均未超过 FDA 的食品安全限量标准,但是摄食 AFB₁ 50 μg/kg 饲料的异育银鲫成鱼肝胰脏 AFB₁ 积累超过安全限量标准。因此,设定饲料的安全标准为 20 μg/kg 是比较合理的。但无论如何,在向动物投饲受霉菌毒素污染的饲料或原料时都应该保持警惕。

4 结论

异育银鲫成鱼至少可耐受 AFB₁ 含量达 500 μg/kg 饲料(实测值: 454.07 μg/kg 饲料)56d, 死亡率、摄食、生长、饲料利用、性腺发育均未受到显著影响。肝胰脏中的 AFB₁ 积累和饲料中的 AFB₁ 呈对数关系。饲喂 AFB₁ 50 μg/kg 饲料使异育银鲫成鱼肝胰脏 AFB₁ 积累超过安全限量标准。肌肉和性腺中的黄曲霉毒素残留量低于 FDA 食品安全限定标准。

参考文献:

[1] Halver J E. Aflatoxicosis and trout hepatoma. In: Goldblatt L A (Eds.), *Aflatoxin: Scientific Background, Control, and Implications* [M]. New York: Academic Press. 1969, 265—306
 [2] Sahoo P K, Mukherjee S C. Immunosuppressive effects of aflatoxin B₁ in Indian major carp (*Labeo rohita*) [J]. *Com-*

parative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2001, **24**: 143—149
 [3] Boonyaratpalin M, Supamattaya K, Verakunpiriya V, *et al.* Effects of aflatoxin B₁ on growth performance, blood components, immune function and histopathological changes in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) [J]. *Aquaculture Research*, 2001, **32**(Suppl. 1), 388—398
 [4] Bonomi A, Quarantelli A, Zambin E M, *et al.* Effects of aflatoxin B₁ contaminated rations on productive and reproductive efficiency in swine [J]. *Rivista Di Scienza Dell'Alimentazione*, 1995, **24**: 361—384
 [5] El-Banna R, Teleb H M, Hadi M M, *et al.* Performance and tissue residue of tilapia fed dietary aflatoxin [J]. *Veterinary Medical Journal Giza*, 1992, **40**: 17—23
 [6] Schoenhard G L, Hendricks J D, Nixon J E, *et al.* Aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and the synergistic effects of cyclopropanoid fatty acids [J]. *Cancer Research*, 1981, **41**: 1011—1014
 [7] Jantrarat W, Lovell, R T. Subchronic toxicity of dietary aflatoxin B₁ to channel catfish [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1990, **2**(4): 248—254
 [8] El-Sayed Y S, Khalil R H. Toxicity, biochemical effects and residue of aflatoxin B₁ in marine water-reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2009, **47**: 1606—1609
 [9] Wu F C. Retention of diet-related mycotoxins in tissues of channel catfish [D]. Auburn University, Auburn, Alabama, USA, Doctoral dissertation. 1998
 [10] FDA, 2007. Action levels for poisonous or deleterious substances in human food and animal feed. United States Food and Drug Administration (USFDA). Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/fdaact.html>. Accessed 28 September 2007
 [11] Han D, Xie S, Zhu X, *et al.* Growth and hepatopancreas in gibel carp fed diets containing low levels of aflatoxin B₁ [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2009, **16**(4): 335—342
 [12] Zhang Z Q, Bo F, Zhang K Y, *et al.* Regularities of distribution about aflatoxin B₁ in Chinese diets [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2009, **45**(12): 27—30 [张志强, 柏凡, 张克英, 等. 我国饲料中黄曲霉 B₁ 污染的分布规律研究. 中国畜牧杂志, 2009, **45**(12): 27—30]
 [13] Qian X Q. Nutritional energetics in Chinese long-snout catfish and gibel carp in relation to dietary protein level [D]. Thesis for Doctor of Science. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan. 2001 [钱雪桥. 长吻鮠和异育银鲫幼鱼饲料蛋白需求的比较营养能量学研究. 博士学位论文, 中国科学院水生生物研究所, 武汉. 2001]
 [14] Tuan N A, Grizzle J M, Lovell R T, *et al.* Growth and hepatic lesions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing aflatoxin B₁ [J]. *Aquaculture*, 2002, **212**: 311—319
 [15] AOAC (Association of Official Analytical Chemists) [M]. Animal Feed. In: Williams S (Eds.), *Official Methods of*

- Analysis, 14th edn AOAC, Inc., Arlington, VA, Washington, DC. 1984, 152—161
- [16] Santacroce M P, Conversano M C, Casalino E, *et al.* Aflatoxins in aquatic species: metabolism, toxicity and perspectives [J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2008, **18**: 99—130
- [17] Chávez-Sánchez M C, Martínez Palacios C A, Osorio M I, *et al.* Pathological effects of feeding young *Oreochromis niloticus* diets supplemented with different levels of aflatoxin B₁ [J]. *Aquaculture*, 1994, **127**: 49—60
- [18] Deng S X, Tian L X, Liu F J, *et al.* Toxic effects and residue of aflatoxin B₁ in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) [J]. *Aquaculture*, 2010, **307**: 233—240
- [19] Ngethe S, Horsberg T E, Mitema E, *et al.* Species differences in hepatic concentration of orally administered 3H AFB₁ between rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Aquaculture*, 1993, **114**: 355—358
- [20] Raghavan P R, Zhu X, *et al.* Low levels of aflatoxin B₁ could cause mortalities in juvenile hybrid sturgeon, *Acipenser ruthenus* ♀ × *A. baerii* ♂ [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2011, **13**: 39—47
- [21] Manning B, Li M H, Robinson E H. Aflatoxins from moldy corn cause no reductions in channel catfish *Ictalurus punctatus* performance [J]. *Journal of the Aquaculture Society*, 2005, **36**(1): 59—67
- [22] Guellgerieh F P, Johnson W W, Shimada T, *et al.* Activation and detoxication of aflatoxin B₁ [J]. *Mutation Research (Full Set)*, 1998, **40**(2): 121—128
- [23] Joner A, 2000. Mycotoxins (<http://www.ansci.cornell.edu/courses/as625/1999term/toner/aflatoxins.html>)
- [24] Shi Y H, Xu Z R, Wang C Z. Effects of aflatoxin on growth performance and immunology and antioxidant indices in pigs [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2007, **27**(5): 733—736 [史莹华, 许梓荣, 王成章. 黄曲霉毒素对猪生长性能及免疫和抗氧化指标的影响. *中国兽医学报*, 2007, **27**(5): 733—736]
- [25] Rastogi R, Srivastava, A K, Rastogi A K. Biochemical changes induced in liver and serum of aflatoxin B₁-treated male wistar rats: preventive effect of picroliv [J]. *Pharmacology & Toxicology*, 2001, **88**: 53—58
- [26] Coppock R W, Reynolds R D, Buck W B, *et al.* Acute aflatoxicosis in feeder pigs, resulting from improper storage of corn [J]. *American Veterinary Medical Association*, 1989, **15**(10): 1380—1381
- [27] Egbunike G N. Histochemical assessment of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in the testes of rats following acute administration of aflatoxin B₁ [J]. *Toxicology Letters*, 1981, **3**: 279—282
- [28] Cook W O, Richard J L, Osweiler G D, *et al.* Clinical and pathologic changes in acute aflatoxicosis: rumen motility and tissue and fluid concentrations of aflatoxins B₁ and M₁ [J]. *Online Journal of Veterinary Research*, 1986, **47**: 1817—1825
- [29] Fernández A, Belío R, Ramos J J, *et al.* Aflatoxins and their metabolites in the tissues, faeces and urine from lambs feeding on an aflatoxin-contaminated diet [J]. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science*, 1997, **74**: 161—168
- [30] Bintvihok A, Kositcharoenkul S. Effect of dietary calcium propionate on performance, hepatic enzyme activities and aflatoxin residues in broilers fed a diet containing low levels of aflatoxin B₁ [J]. *Toxicon*, 2006, **47**: 41—46
- [31] Bintvihok A, Thiengnin S, Doi K, *et al.* Residues of aflatoxins in the liver, muscle and eggs of domestic Fowls [J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2002, **64**: 1037—1039
- [32] Valsta L M, Hendricks J D, Bailey G S. The significance of glutathione conjugation for aflatoxin B₁ metabolism in rainbow trout and coho salmon [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 1988, **26**: 129—135
- [33] Chen C, Pearson A M, Coleman T H, *et al.* Tissue deposition and clearance of aflatoxins from broiler chickens fed a contaminated diet [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 1984, **22**: 447—451
- [34] Plakas S M, Loveland P M, Bailey G S, *et al.* Tissue deposition and excretion of 14C-labeled aflatoxin B₁ after oral administration in channel catfish [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 1991, **29**: 805—808
- [35] Oliveira C A, Kobashigawa E, Reis T, *et al.* Aflatoxin B₁ residues in eggs of laying hens fed a diet containing different levels of the mycotoxin [J]. *Food Additives and Contaminants*, 2000, **17**: 459—462

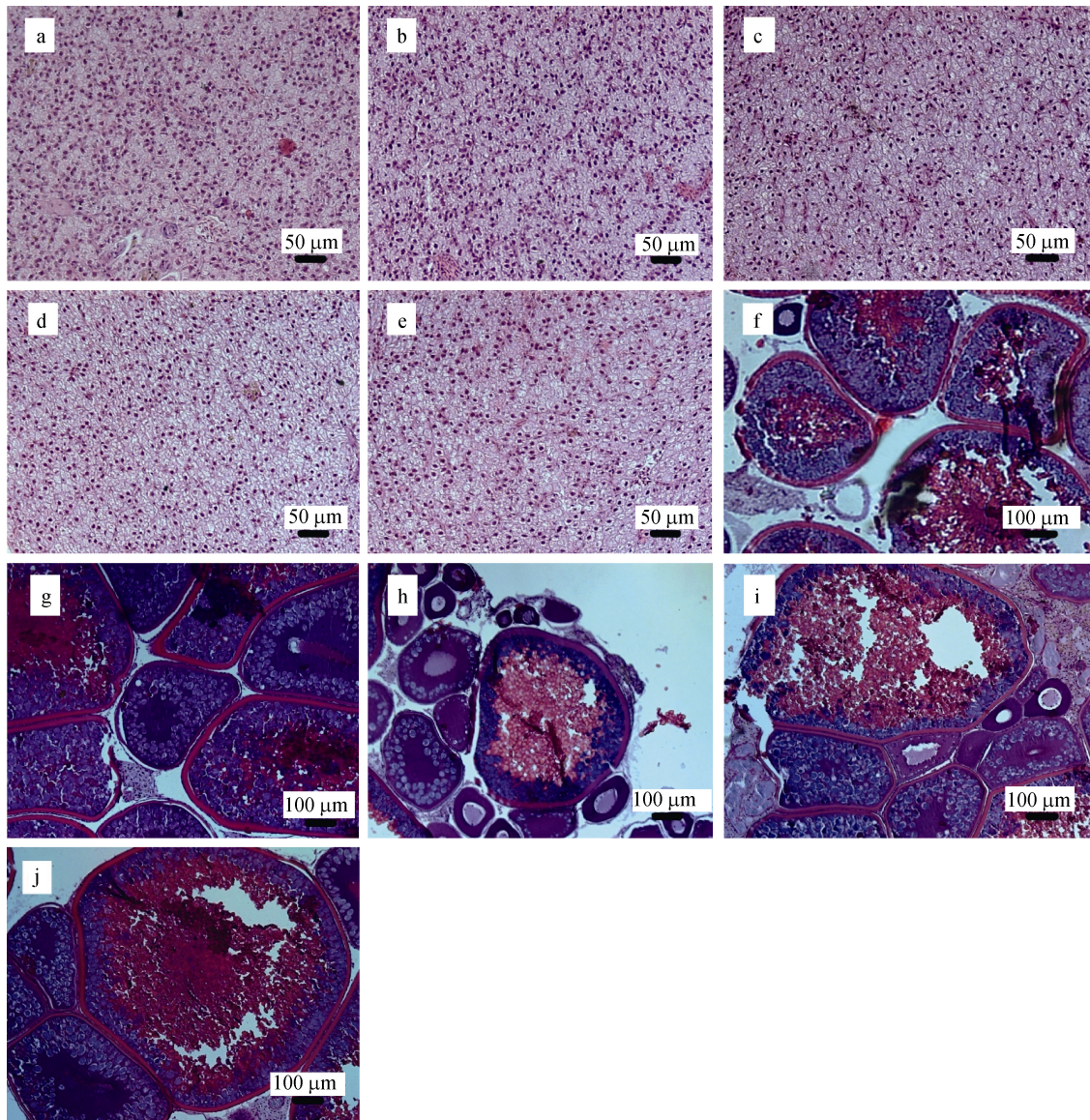
GROWTH AND AFLATOXIN B₁ ACCUMULATION OF GIBEL CARP ADULT FED WITH DIETS OF DIFFERENT LEVELS OF AFLATOXIN B₁

HUANG Ying^{1,2}, ZHU Xiao-Ming¹, HAN Dong¹, YANG Yun-Xia¹, JIN Jun-Yan¹,
LI Hai-Yan¹, CHEN Yi-Feng^{1,3} and XIE Shou-Qi¹

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 3. Laboratory of Biological Invasion and Adaptive Evolution, Wuhan 430072, China)

Abstract: A 56-day feeding trial was conducted to evaluate the effect of dietary aflatoxin B₁ (AFB₁) on growth, physiological responses, histological changes, and accumulation in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) adult. Triplicate groups of gibel carp [(122.3 ± 0.7) g] were fed with five semi-purified diets (Diet 1 to 5) containing 0, 5, 20, 50 and 500 µg/kg AFB (determined level was 2.59, 4.12, 12.39, 46.23 and 454.07 µg AFB₁/kg diet, respectively). During the experiment, photoperiod was 12D 12L with the light period from 09:00 to 21:00, dissolved oxygen was above 6 mg/L, ammonia-N was less than 0.4 mg/L and pH was about 6.8. The results showed that during the 56-day of AFB₁ exposure, no external changes and unusual behavior were observed in the fish fed with various levels of AFB₁. The survival rate in all groups attained 100%. There was no significant difference in final body weight, feeding rate (FR), specific growth rate (SGR) and feed efficiency (FE) between the control and the other groups. Fish fed with various levels of AFB₁ showed no significant differences in total cholesterol, activities of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartic aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP) and superoxide dismutase (SOD) compared to the control group. No significant histological lesions in hepatopancreas and ovary were identified between the control and increasing AFB₁ treatments. Low AFB₁ residues were found in muscles and ovary, and were below the safety limitation of 5 µg/kg. Accumulation of AFB₁ in hepatopancreas was logarithmically correlated to the dietary AFB₁ level. Our results indicated that gibel carp was a less susceptible species to AFB₁ exposure up to approximately 500 µg/kg diet (determined level was 454.07 µg/kg diet), at least for 56 days.

Key words: Aflatoxin B₁; *Carassius auratus gibelio*; Growth; Accumulation



图版 Plate

饲喂对照组饲料(a), 饲料2(b), 饲料3(c), 饲料4(d), 饲料5(e)56d后异育银鲫成鱼肝胰脏的组织学变化(H&E, 标尺为50 μm); 饲喂对照组饲料(f), 饲料2(g), 饲料3(h), 饲料4(i), 饲料5 (j)56d后异育银鲫成鱼卵巢的组织学变化(H&E, 标尺为100 μm)

Hepatopancreas of gibel carp fed with the control diet (a), Diet 2 (b), Diet 3 (c), Diet 4(d), Diet 5 (e) for 56d (H&E, Bar = 50 μm); Ovary of gibel carp fed with the control diet (f), Diet 2 (g), Diet 3 (h), Diet 4(i), Diet 5 (j) for 56d (H&E, Bar = 100 μm)