

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00388

微囊藻毒素在滇池鱼体内的积累水平及分布特征

吴幸强^{1,2} 龚艳³ 王智^{1,2} 刘旻^{1,2} 陈旭东¹ 肖邦定¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049;
3. 湖北省农业科学院农业测试与科技信息中心, 武汉 430064)

摘要: 为了解富营养化水体中鱼体内微囊藻毒素(MC)的积累水平及其分布特征, 2003年4月和9月份两次在滇池试验区采集了鲢、鳙和草鱼等鱼种, 用ELISA方法对鱼体中肝、肾、空肠、胆、肌肉等不同组织中MC的含量进行了检测。结果表明, MC在所有样品中均能检测到, 且主要分布在鱼体的肝肾和消化道等器官, 而肌肉和非消化道器官中毒素含量相对较低。不同鱼种不同组织对MC的富集程度也明显不同, 鲢鳙中肝脏和肾脏这两个主要的靶器官对MC的蓄积能力就远高于草鱼。同时, 不同季节MC在鱼体内的积累水平也明显不同, 4月份鱼样中MC的含量普遍低于9月份鱼样中MC的含量。最后按照WHO生活饮用水安全标准的建议进行推算, 所有鱼肉中的MC均没有超过其推荐的人体每日可允许摄入量(0.04 μg/kg 人体重), 初步推断鱼肉中MC暂时还未危及到人体健康, 但仍具有潜在的风险性。

关键词: 滇池; 鱼体; 微囊藻毒素; 积累水平; 分布特征

中图分类号: X503.2; R155.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)02-0388-06

湖泊富营养化和蓝藻水华暴发已成为国内外普遍关注的环境问题。调查显示, 我国淡水湖泊中发生的水华80%是有毒的。在有毒蓝藻水华产生的毒素中, 微囊藻毒素(Microcystin, MC)是分布最广、毒性最大的种类之一^[1]。目前, 已有不少报道称长期暴露于MC的鱼、虾、蟹体内有MC的生物富集, 且在肌肉中也检测到了较高浓度的MC^[2-5]。近年来, 非经典的生物操纵法, 即通过控制凶猛性鱼类及放养滤食性鱼(鲢、鳙、罗非鱼等)来直接牧食蓝藻水华的操纵法, 在国内外研究中越来越多^[6-9]。该方法很有可能导致MC富集于鱼体并通过食物链传递。MC通过食物链, 特别是长期少量摄入可能会引起急性或慢性的毒性效应, 将直接威胁到人类的健康和消费安全。因此, 开展MC在鱼体内的积累水平及分布特征的相关研究显得十分必要。

本研究以滇池生物控藻试验区中的草鱼以及用于生物控藻所投放的大量能直接牧食蓝藻水华的鲢、鳙为研究对象, 分别在蓝藻水华稀薄期和暴发

期对MC在鱼体不同组织中的积累水平及分布特征进行了分析, 并对鱼肉中MC的污染是否构成食品安全威胁进行了初步的评估。

1 材料与方法

1.1 材料来源

调查区域 “滇池蓝藻水华污染控制技术研究”试验区位于滇池东北部(滇池污染最严重区域之一), 由马村湾和海东湾两部分组成, 地理位置为东经102°41'8"—102°46'6"北纬24°55'0"—24°56'1", 试验区面积6.01 km², 由非封闭的高强度抗风浪柔性围栏将试验区与外湖分隔开来。试验区示意图(图1)。

样品采集和处理 在2003年4月份和9月份两次在该试验区采集了滇池野生的草鱼以及用于生物控藻投放的鲢和鳙。鱼样的主要基本参数(表1)。

样品处理: 量取鱼的全长和体长, 称量鱼的体重后, 去除鱼鳞、鱼头, 洗净, 用粗滤纸吸干表面水分, 用解剖刀纵剖, 取肝、肾、空肠、胆等内脏, 然

收稿日期: 2008-09-12; 修订日期: 2009-08-12

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2008CB418101); NSFC-云南联合基金(U0833604); 中国科学院重要方向项目(KZCX2-YW-426)资助

作者简介: 吴幸强(1982—), 男, 湖北通城人; 在读博士研究生; 主要研究方向为水体污染控制。E-mail: xqwu@ihb.ac.cn

通讯作者: 肖邦定, E-mail: bdxiao@ihb.ac.cn

后取每条鱼的一半, 剔除鱼刺, 取背脊肌肉, 用组织捣碎器匀浆。最后将所有样品冷冻干燥(ALPHA 1-2, CHRIST), 干燥后碾磨成粉末状, -20°C 冷冻保存备用。

1.2 样品中 MC 的提取及测定

样品中 MC 的提取参照 Magalhaes, *et al.*^[2] 的提取方法并进行了优化: 准确称取鱼肉 1.5 g, 鱼肝、肾等内脏 0.5 g 分别置于 20 mL 的洁净硬质玻璃样品瓶中, 加入适量的 100% 甲醇完全覆盖样品, 浸泡 2d 后在磁力搅拌器上搅拌提取 2h, 离心(4200 r/min, 20min), 取上清液, 残渣再用 6 mL 100% 甲醇重复

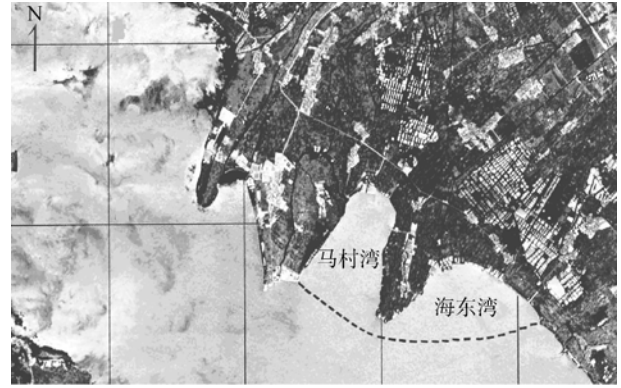


图 1 试验区在滇池中的地理位置
Fig. 1 Map of the test area in Lake Dianchi

表 1 样品的基本参数
Tab. 1 The basic parameters of samples

种类 Species	2003 年 4 月 April (2003)			2003 年 9 月 September (2003)		
	体长 Length (cm)	体重 Weight (g)	尾数 No.	体长 Length (cm)	体重 Weight (g)	尾数 No.
鲢 <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	28.5—49	421—1534	6	19—32	120.72—530	6
鳙 <i>Aristichthys nobilis</i>	51—60	3132—5500	4	22—42	151.73—1663	4
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	29—37	756—1312	2	34—35	795—863	2

提取 2 次, 离心, 合并上清液。用等体积正己烷萃取上清液 3 次, 弃去正己烷。上清液在旋转蒸发器中减压浓缩至近干, 用重蒸水稀释至约 20%, 过预先已活化的 Sep-Pak C18 固相萃取小柱(10 mL 100% 甲醇活化, 10 mL 重蒸水调整)。依次用 10 mL 重蒸水、10 mL 20% 甲醇淋洗小柱, 吹干, 用 10 mL 含 0.1% TFA 的甲醇洗脱, 洗脱液在旋转蒸发器中减压浓缩至干。用 1 mL 去离子水定容在 1.0 mL 的 eppendorf 管中, -20°C 冰箱冷冻保存待测。

样品中 MC 的测定均采用间接竞争酶联免疫法(Indirect cELISA), 检测灵敏度为 0.1 ng/mL ^[10-12], 最后样品中 MCs 的浓度均换算成 MC-LR 的浓度。

1.3 统计方法

采用 SPSS 统计软件进行数据统计分析。鱼样中的 MC 含量用 $\bar{x} \pm s$ 表示。以 $\alpha=0.05$ 为统计检验水平, 通过单因素方差分析进行组间差异的显著性检验, 均数间多重比较用 LSD 法。

2 结 果

2.1 不同鱼种各组织中 MC 的含量

2003 年 4 月份和 9 月份两次采集的鱼样各组织中 MC 测定结果(图 2 和图 3)显示, MC 在鲢、鳙不

同组织中的积累水平有明显的差异($P < 0.05$), 均表现为: 肾 > 肝 > 空肠 > 胆 > 肌肉 > 血样, 其中肝肾肾脏中 MC 含量最高, 检测到的最大浓度分别为 860、2110 $\mu\text{g/kg}$, 空肠和胆脏中次之, 检测到的最大浓度分别为 240、96 $\mu\text{g/kg}$, 肌肉和血样中含量最低; 而草鱼不同组织中 MC 含量的差异不是很明显, 表现为: 胆 > 空肠 > (肾、肝、肌肉、血样), 空肠和胆脏中 MC 含量最高, 检测到的最大浓度分别为 23、48 $\mu\text{g/kg}$, 其他组织中 MC 含量均不高($< 10 \mu\text{g/kg}$)。

2.2 不同季节鱼体中 MC 含量

从图 2 和图 3 中也可以看出, 不同季节鱼体中 MC 的积累水平也明显不同。无论是体重差不多的草鱼还是放养时间不同的鲢、鳙, 4 月份的样品中草鱼和鲢的肝脏、肾脏、空肠中 MC 含量均低于 9 月份样品, 同时鳙除了肾脏外, 肝脏、空肠中 MC 的含量也明显低于 9 月份样品。

2.3 鱼肉中 MC 的积累水平及其推算

如图 2 和图 3 所示, 鲢、鳙和草鱼肌肉中也均检测出微量的 MC, 按鱼肉的平均含水率 82% 计算, 每千克鲜重鲢中的 MC 含量为 0.0342—1.5840 μg , 鳙为 0.0270—1.9440 μg , 草鱼 0.0882—0.8298 μg 。按人均每天吃鱼 300 g 计算, 则相当于人体每天摄

入的 MC 量为 0.0103—0.4752 μg (鲢)、0.0081—0.5832 μg (鳙)、0.0265—0.2489 μg (草鱼)。根据 WHO 规定的人体每日可允许摄入的 MC 量 TDI (Tolerable Daily Intake)(0.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 人体重)的标准^[1], 婴儿、儿童和成人的体重分别按 5、10、60 kg

计算, 可以推算出每人每天可摄入的微囊藻毒素的含量(表 2)。除按婴儿的体重推算的结果外, 儿童和成人的体重推算的结果均没有超过 WHO 推荐的人体每日可允许摄入的微囊藻毒素量(0.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 人体重)的标准。

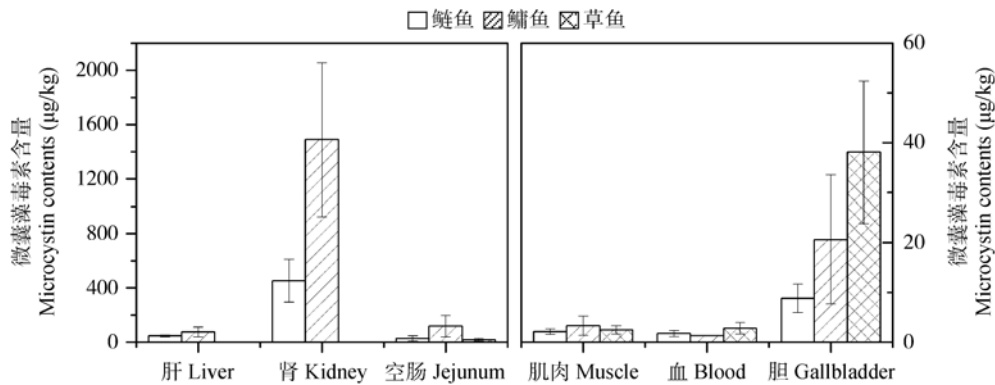


图 2 2003 年 4 月滇池鱼样不同组织微囊藻毒素含量

Fig. 2 Content of microcystin of tissues in fish samples from Dianchi Lake in April 2003

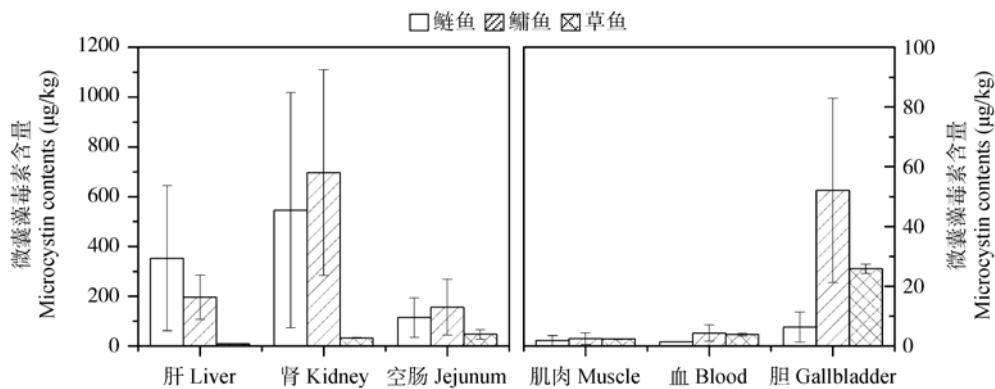


图 3 2003 年 9 月滇池鱼样不同组织微囊藻毒素含量

Fig. 3 Content of microcystin of tissues in fish samples from Dianchi Lake in September 2003

表 2 推算出每人每天可摄入肌肉中 MC 的含量

Tab. 2 Microcystins concentration in fish muscles ($\mu\text{g}/\text{kg}$ 人体重)

鱼种 Fish species	No.	婴儿 Infant	儿童 Child	成人 Adult
鲢 <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	26	0.0229±0.0189	0.0114±0.0095	0.0019±0.0016
鳙 <i>Aristichthys nobilis</i>	26	0.0323±0.0311	0.0161±0.0155	0.0027±0.0026
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	7	0.0217±0.0184	0.0109±0.0092	0.0018±0.0015

3 讨论

3.1 MC 在不同鱼种各组织中的积累水平及分布规律

本研究结果表明, MC 在鲢和鳙不同组织中的积累和分布方面具有明显的规律性, 检测到的 MC 主要分布在鱼体的肝肾脏和消化道等器官, 而肌肉

和非消化道器官中毒素含量相对较低。肝脏和肾脏中 MC 含量很高, 这与许多文献报道一致^[13—15]。肝、肾脏是主要的致毒靶器官, 对 MC 具有很大的蓄积能力。这种明显的差异也说明了, MC 在鱼体内的分布和积累与不同组织的生理功能密切相关; MC 除了容易富集于肝肾脏外, 也会在消化道和胆囊中

富集。这与 Chen, *et al.* 的研究结论一致^[16]。

此外, 草鱼不同组织中 MC 的积累水平与鲢、鳙具有明显的差异, 主要表现为肝肾脏中 MC 的含量远远低于鲢鳙肝肾脏中 MC 的含量。这种明显差异可能与它们吞食藻类的食性有关。鲢的食物以浮游植物为主, 鳙则以浮游动物为主, 但它们均以滤食蓝藻为主, 而草鱼主要以水生微管束植物为食。这也间接的表明, MC 进入水生动物的主要途径是: 水生动物摄食有毒蓝藻或毒素污染的低级水生动植物使 MC 经食物链迁移进入体内。这与有关报道^[17,18]结论正好一致, 由于在暴发水华时的高 pH (>8) 条件下, MC-LR 的正辛醇/水分配系数值低以及 MC-LR 的相对分子质量较大, MC-LR 通过被动扩散直接进入生物体内的量可能十分有限, 而应该主要是随摄取的食物通过消化道进入动物体内。

3.2 不同季节鱼体中 MC 含量的差异性分析

已有很多文献报道^[2,3,19], 鱼体对 MC 积累水平可能是长期富集的结果, 放养的时间越长, MC 含量有可能越高, 但无论是体重差不多的草鱼还是放养时间不同的鲢、鳙, 4 月份的样品中草鱼和鲢的肝脏、肾脏、空肠中 MC 含量均低于 9 月份样品, 同时鳙除了肾脏外, 肝脏、空肠中 MC 的含量也明显低于 9 月样品。这可能需要考虑到 9 月份滇池水华暴发严重, 鲢鳙可能滤食更多的有毒蓝藻而积累更多的藻毒素。另一方面, 这也可能与鱼体不同组织的代谢能力有关, 可以推测淡水鱼类经过很长时间蓄积后, 可能具有自身降解 MC 的能力。这说明了不同时间同一水华湖泊, 影响鱼对 MC 的富集因素很多。生物蓄积过程不仅要考虑鱼的种属, 还需要考虑到环境条件的变化。但究竟是哪种影响因素起主要作用还需进一步研究。

3.3 鱼肉中 MC 对人类健康的风险评价

淡水鱼类作为一种十分重要的食物蛋白质来源, 其肌肉中积累的 MC 对人类健康可能具有潜在的危害, 因此很有必要对鱼肉中 MC 的污染是否构成食品安全威胁进行风险评价。

本文根据 WHO 规定的人体每日可允许摄入的 MC 量(0.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 人体重) 的标准, 按儿童和成人的体重推算的每人每天摄入的微囊藻毒素含量均没有超过 WHO 推荐的人体每日可允许摄入的微囊藻毒素量(0.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 人体重) 的标准, 并初步推断鱼肉中 MC 还未危及到人体健康, 但儿童和婴儿均比

成人具有更高的摄入蓝藻毒素的危险。这提示滇池水体有毒蓝藻污染所产生的毒素已经影响到水产品的质量并存在潜在的食品安全风险。同时也有报道显示^[2,15], 即使在无水华的季节, 水体中或浮游植物中在已经检测不到 MC 存在的条件下, 水产品依然可以检测出一定浓度的 MC。这个结果显示, 水生动物体内累积 MC 有一定的持久性。如果长期食用这种鱼类, 就会在体内造成积累, 存在潜在的风险, 会引起疾病。至于准确的安全阈值和低剂量的长期影响还需要进一步做深入的工作。如有可能可对滇池渔民进行流行病学调查并进行相应食品安全性评价工作。

4 结 论

(1) MC 在所有样品中均能检测到, 且主要分布在鱼体的肝肾脏和消化道等器官, 而肌肉和非消化道器官中毒素含量相对较低。

(2) 不同鱼种不同组织对 MC 的富集程度不同, 能直接牧食蓝藻水华的滤食性鱼(鲢、鳙)中肝脏和肾脏这两个主要的靶器官对 MC 的蓄积能力就远高于主要以水生微管束植物为食的草鱼。

(3) 不同季节鱼体中 MC 的积累水平也明显不同, 4 月份鱼样中 MC 的含量普遍低于 9 月份鱼样中 MC 的含量。

(4) 本文同时还检测到鱼肉中的 MC 含量均没有超过 WHO 推荐的人体每日可允许摄入的微囊藻毒素量(0.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 人体重) 的标准, 并初步推断鱼肉中 MC 还未危及到人体健康。但仍具有潜在的风险性, 应加强对水产品中 MC 污染的动态检测, 并进行相应食品安全性评价工作。

参考文献:

- [1] Chorus I, Bartram J (Eds.), Toxic Cyanobacteria in Water: a guide to their public health consequences, monitoring and management (London, E & FN Spon). 1999
- [2] Freitas de Magalhaes, V Moraes Soares R, Azevedo S M F O. Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk [J]. *Toxicon*, 2001, 39(7): 1077—1085
- [3] Magalhaes V F, Marinho M M, Domingos P, *et al.* Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil R J) [J]. *Toxicon*, 2003, 42(3): 289—295
- [4] Xie L, Xie P, Guo L, *et al.* Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish at different

- trophic levels from the eutrophic Lake Chaohu, China [J]. *Environmental Toxicology*, 2005, **20**(3): 293—300
- [5] Mohamed Z A, Carmichael W W, Hussein A A. Estimation of microcystins in the freshwater fish *Oreochromis niloticus* in an Egyptian fish farm containing a *Microcystis* bloom [J]. *Environmental Toxicology*, 2003, **18**(2): 137—141
- [6] Jones G J, Poplawski W. Understanding and management of cyanobacterial blooms in sub-tropical reservoirs of Queensland, Australia [J]. *Water Science and Technology*, 1998, **37**(2): 161—168
- [7] Datta S, Jana B B. Control of bloom in a tropical lake: Grazing efficiency of some herbivorous fishes [J]. *Journal of Fish Biology*, 1998, **53**(1): 12—24
- [8] Liu J K, Xie P. Unraveling the enigma of the disappearance of water bloom from the east lake (Lake Donghu) of Wuhan [J]. *Resources and Environment in the Yangtze Basin*, 1999, **8**(3): 312—319 [刘建康, 谢平. 揭开武汉东湖蓝藻水华消失之谜. 长江流域资源与环境, 1999, **8**(3): 312—319]
- [9] Liu J K, Xie P. Direct control of microcystis bloom through the use of Planktivorous Carp-closure Experiments and Lake Fishery Practice [J]. *Ecologic Science*, 2003, **22**(3): 193—198 [刘建康, 谢平. 用鲢鳙直接控制微囊藻水华的围隔试验和湖泊实践. 生态科学, 2003, **22**(3): 193—198]
- [10] Lei L M, Gan N Q, Zhang X M, *et al.* Comparison of IC ELISA, Indirect cELISA, and Direct ELISA methods for determination of microcystins [J]. *High Technology Letters*, 2004, **14**(7): 89—92 [雷腊梅, 甘南琴, 张小明, 等. 三种检测微囊藻毒素的 Elisa 方法比较研究. 高技术通讯, 2004, **14**(7): 89—92]
- [11] Wang Z H, Lin S J, Han B P, *et al.* Distribution of microcystins in typical water supply reservoirs and lakes in Guangdong Province [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(3): 307—311 [王朝晖, 林少君, 韩博平, 等. 广东省典型大中型供水水库和湖泊微囊藻毒素分布. 水生生物学报, 2007, **31**(3): 307—311]
- [12] Ueno Y, Nagata S, Tsutsumi T, *et al.* 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*, 1996, **17**(6): 1317—1321
- [13] Sui H X, Yan W X, Xu H B. Toxicity of microcystin and its bioaccumulation effect [J]. *Journal of Hygiene Research*, 2002, **31**(3): 214—216 [隋海霞, 严卫星, 徐海滨. 微囊藻毒素的毒性以及水生生物的富集作用. 卫生研究, 2002, **31**(3): 214—216]
- [14] Ding W X. Cyanobacteria cause mitochondria membrane potential alterations and reactive oxygen species formation in primary cultured rat hepatocytes Environ [J]. *Health Prospect*, 1998, **106**: 409
- [15] Brooks W P, Codd G A. Distribution of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin and interactions with hepatic microsomes in mice [J]. *Pharmacol Toxicol*, 1987, **60**(3): 187—191
- [16] Chen J, Xie P. Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and-RR in two freshwater shrimps, *Palaemon modestus* and *Macrobrachium nipponensis*, from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China [J]. *Toxicon*, 2005, **45**(5): 615—625
- [17] de Maagd P G J, Hendriks A J, Seinen W, *et al.* pH-Dependent hydrophobicity of the cyanobacteria toxin microcystin-LR [J]. *Water Research*, 1999, **33**(3): 677—680
- [18] Ibelings B W, Bruning K, de Jonge J, *et al.* Distribution of Microcystins in a Lake Foodweb: No Evidence for Biomagnification [J]. *Microbial Ecology*, 2005, **49**(4): 487—500
- [19] Xu H B, Sun M, Sui H X, *et al.* Microcystin contamination of fish on Poyang Lake in Jiangxi Province [J]. *Journal of Hygiene Research*, 2003, **32**(3): 192—194 [徐海滨, 孙明, 隋海霞, 等. 江西鄱阳湖微囊藻毒素污染及其在鱼体内的动态研究. 卫生研究, 2003, **32**(3): 192—194]

RESIDUE LEVELS AND DISTRIBUTION FEATURES OF MICROCYSTINS IN FISH SAMPLES FROM LAKE DIANCHI

WU Xing-Qiang^{1,2}, GONG Yan³, WANG Zhi^{1,2}, LIU Min^{1,2}, CHEN Xu-Dong¹ and XIAO Bang-Ding¹

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072;

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049;

3. Agricultural Testing and Information Center, Hubei Academy of Agriculture Science, Wuhan 430064)

Abstract: The occurrence of heavy water blooms of cyanobacteria (blue-green algae, BGA) in surface water is receiving increasing attention world wide as a potential health concern. This is a serious water quality problem because many of the cyanobacterial species or strains are able to produce potent toxins. The most frequently reported cyanobacterial toxins are cyclic heptapeptide hepatotoxins, microcystins, isolated from several species of the freshwater genera *Microcystis*, *Planktothrix* (*Oscillatoria*), *Anabaena* and *Nostoc*. They are potent and specific inhibitors of the serine threonine family of protein phosphatases, especially PP1 and PP2A. In order to minimize public exposure to MCs, the World Health Organization (WHO) has set a provisional guideline value of 1 µg/L for MC-LR in drinking water and established the tolerable daily intake (TDI) for consumption of cyanobacteria products contends MCs (0.04 µg/kg/day). Aquatic animals could bioaccumulate microcystins(cyanobacteria hepatotoxins) and so, beyond water, the ingestion of contaminated food represents a human health risk. In order to evaluate the potential risk of their ingestion, this study was mainly investigated the residue levels and distribution features of microcystins in fish from eutrophicated Lake Dianchi, a hypertropic lake in Yunnan Province containing toxic cyanobacteria blooms all the year round. Samples of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), bighead carp (*Aristichthys nobilis*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) were collected in the biomanipulation test area in Lake Dianchi respectively in April and September, 2003. Microcystins in different tissues were all analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the concentration was expressed as microcystin-LR equivalent. The results showed that microcystins presented in all samples, mainly distributing in liver, kidney and digestive tracts, and little in the muscle and the non-digestive tract organs. Different residue levels of microcystins were obviously in different fishes. Concentrations of microcystins in liver and kidney, the target organs of silver carp as well as bighead carp were significantly higher than that in grass carp. On the other hand, the residue levels of microcystins were also changeable along with seasons. Concentrations of microcystins in fish samples in April were lower than that in September. Finally, the safety assessment of the microcystin in fish muscle was also evaluated. According to the standard recommended by WHO, we calculated that the concentration of microcystins in fish muscle of all samples were not above the limit for human consumption. Then, we simply concluded that microcystins in fish muscle had not yet endangered to the human health only existed in the potential health risks.

Key words: Lake Dianchi; Fish; Microcystin; Residue levels; Distribution features