

doi: 10.7541/2021.2020.136

饲喂不同浓度黄曲霉毒素B₁饲料对花鳗鲡幼鱼生长、 抗氧化能力和毒素积累的影响

黄莹^{1,2} 韩金高² 朱晓鸣³ 赵一新² 王寿昆² 胡职豪² 陈新华^{1,2}

(1. 福建农林大学海洋研究院, 福建省海洋生物技术重点实验室, 福州 350002; 2. 福建农林大学动物科学学院, 福州 350002;
3. 中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

摘要: 以含不同浓度黄曲霉毒素B₁(AFB₁) (0、10、100和1000 µg/kg饲料)的4种饲料饲喂平均初始体重为(6.41±0.10) g的花鳗鲡(*Anguilla marmorata*)幼鱼56d, 探讨AFB₁对花鳗鲡幼鱼生长性能、抗氧化能力、肝脏组织结构及鱼体肌肉中的毒素积累的影响。结果表明, 各实验组幼鱼均未表现出行为及体色的异常。1000 µg/kg毒素组幼鱼的存活率、终末体重、摄食率、特定生长率和饲料效率显著低于对照组, 10 µg/kg毒素组和100 µg/kg毒素组与对照组无显著差异。10 µg/kg毒素组幼鱼肝脏超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、谷胱甘肽S转移酶(GST)活性和丙二醛(MDA)含量与对照组无显著差异。饲料AFB₁含量≥100 µg/kg显著影响花鳗鲡幼鱼肝脏的超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和谷胱甘肽转移酶(GST)活性。对照组和10 µg/kg毒素组幼鱼肝脏组织学观察未发现明显病理变化。1000 µg/kg毒素组幼鱼的肝脏细胞表现出严重的空泡化。随着饲料AFB₁水平的升高, 幼鱼肝脏和肌肉中AFB₁积累量均显著升高。1000 µg/kg毒素组幼鱼肝脏和肌肉中AFB₁积累量分别为17.75和5.98 µg/kg, 均超过FDA食品安全限定标准(5 µg/kg)。由此可见, 饲料中AFB₁≤10 µg/kg对花鳗鲡幼鱼是相对安全的浓度。

关键词: 黄曲霉毒素B₁; 花鳗鲡幼鱼; 生长; 抗氧化能力; 肝脏; 毒素积累

中图分类号: S965.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2021)03-0566-07



黄曲霉毒素(Aflatoxins, AFT)污染是一个全球性的问题, 在热带或亚热带地区尤为严重, 而地区的水产品养殖量占到全球年产量的80%左右^[1]。在高温和高湿的天气下, 饲料原料如花生、玉米、豆粕、鱼粉和鱼类副产品等在贮存期间, 或饲料在加工和青贮过程中, 处理不当容易滋生霉菌, 并进一步产生AFT污染^[2]。Chen和Rawlings^[3]抽查334个亚洲的商品饲料和原料有96.1%的样品含有AFT。王国强等^[4]对中国各省采集的321份饲料和原料样品进行了检测, 平均AFB₁检出率为67.3%; 其中饲料中AFB₁检出率高达84.2%, 阳性样品AFB₁平均值和最高值分别为14.3和43.2 µg/kg。

AFT是由黄曲霉(*Aspergillus flavus*)和寄生曲霉

(*Aspergillus parasiticus*)产生的以二氢呋喃环和香豆素为基本结构的次级代谢产物^[5]。在天然谷物和食品中以AFB₁最为常见^[1]。AFB₁被动物摄入后, 转化为AFB₁-8,9-环氧化物(AFBO), AFBO以共价键结合于DNA、RNA和蛋白质, 形成加合物, 导致肝细胞损伤和肝脏坏死, 而呈现其致癌性^[2,6]。根据中华人民共和国农业行业标准(NY5072-2002), 我国渔用配合饲料中AFB₁的安全限量标准为10 µg/kg^[7]。目前的研究表明, AFB₁会引起水生动物行为异常、生长减缓、免疫抑制、抗氧化损伤和组织病变等^[8-13]。草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)终末体重、摄食率和特定生长率随日粮AFB₁水平的升高呈线性下降, 抗氧化系统和肾脏、脾脏组织结构

收稿日期: 2020-06-08; 修订日期: 2020-11-06

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFD0900200); 福建农林大学科技创新专项基金(CXZX2019064S); 福建省自然科学基金(2016J01093); 淡水生态与生物技术国家重点实验室开放基金(2014FB01)资助 [Supported by the National Key R & D Program of China (2019YFD0900200); Science and Technology Innovation Foundation of Fujian Agriculture and Forestry University (CXZX2019064S); Natural Science Foundation of Fujian Province (2016J01093); Fund Project in State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology (2014FB01)]

作者简介: 黄莹(1982—), 女, 博士; 研究方向为鱼类营养与饲料。E-mail: huangying19822@163.com

通信作者: 陈新华, E-mail: chenxinhua@tio.org.cn

均受到显著影响^[14]。AFB₁会抑制虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)免疫球蛋白的生成以及免疫细胞的增殖^[15]。另外, 动物摄入AFB₁后, 由于AFB₁的高脂溶性, 很快被胃肠道吸收, 并进入循环系统, 而在各个组织中沉积^[2]。异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)摄食1000 μg AFB₁/kg饲料84d后肝胰脏和肌肉AFB₁积累量分别达11.8和2.35 μg/kg^[16]。黄河鲤(*Cyprinus carpio* var)摄食50 μg AFB₁/kg饲料60d后性腺AFB₁含量为2.71 μg/kg^[17]。由于AFT具有热稳定性, 在温度高达268℃左右时才能分解^[5], 食物烹调过程一般难以去除, 因此, AFT可能通过食物链而对人类食品安全造成危害。

花鳗鲡(*Anguilla marmorata*)广泛分布在热带和亚热带水域内, 是分布领域最广的鳗鲡品种^[18]。花鳗鲡在苗种资源里具有较大的资源量, 且在生长后期体型较大, 具有较好的开发前景^[19]。规模化鳗鲡健康养殖的重要物质基础是优质配合饲料^[20]。然而近年来随着鱼粉资源日趋紧张, 鱼粉价格高涨, 为缓解对鱼粉的需求压力, 一些蛋白原料替代了部分鱼粉, 可能对鳗鲡饲料品质造成了一定程度的影响^[21]。迄今为止, 有关AFB₁在水生动物中的毒理学研究尚不完整, 不同品种对AFB₁的敏感性差别较大^[1, 5, 8, 12]。以往的研究表明温水性鱼类比冷水性鱼类更能耐受AFB₁^[2, 22–25]。本实验以饲喂含AFB₁饲料的方式, 开展花鳗鲡幼鱼的亚慢性致毒实验, 旨在研究长期摄食AFB₁对花鳗鲡幼鱼生长、摄食、抗氧化能力和组织学方面的影响, 及AFB₁在肌肉中的积累情况, 进而评估AFB₁污染对花鳗鲡健康养殖造成的潜在威胁。

1 材料与方法

1.1 养殖系统

本实验在微流水养殖系统中进行, 实验系统由12个圆形的pp材质养殖桶组成, 每个桶的底面直径为80 cm, 桶高为70 cm, 实验水体体积为180 L/缸。每缸的水流速度为0.5 L/min。每天监测2次气温和水温。每2周测定水体的溶氧和氨氮含量。实验期间, 水温范围维持在24—28℃。饲养用水为经充分曝气的自来水以保正水体的溶氧含量大于5 mg/L, 氨氮范围为0.2—0.4 mg/L。实验期间水体的pH为6.8—7.0, 光照周期为12L:12D(6:30至18:30)。

1.2 实验饲料及实验设计

实验选用的基础饲料为天马公司生产的幼鳗配合饲料。实验基础饲料的常规化学成分如表1所示。实验基础饲料添加AFB₁配制成不同毒素浓度(0、10、100和1000 μg/kg)的4种实验饲料, 通过酶

联免疫法(ELISA)测得饲料中AFB₁含量分别为1.3、11.6、103.5和989.5 μg/kg饲料, AFB₁浓度的设计参考已有的关于AFB₁在水产动物的研究报告^[1, 2, 24, 25, 35]。制备实验饲料前, 首先将AFB₁(购自美国Sigma公司)溶于橄榄油, 以配制成浓度为500 μg/mL的母液。然后按照设计值添加相应量到大豆油中, 最后将含有不同浓度AFB₁的大豆油按照3%的添加量加到各组实验饲料中混合均匀, 储存于-20℃冰箱。

1.3 实验鱼与饲养实验

实验鱼为花鳗鲡黑仔鳗, 来源于福建省福州市贵安鳗场, 将其在室内养殖系统中暂养2周, 然后转入实验系统驯养1周。暂养和驯化阶段均饲喂实验基础饲料。实验开始前将实验鱼饥饿24h, 然后选取外表无损伤, 活力较好且规格较为一致的花鳗鲡幼鱼240尾(平均体重为6.41 g), 随机放入12个实验鱼缸中。将这12个缸随机分成4个实验组, 每组3个平行, 每缸20尾, 进行为期56d的养殖实验。暂养和实验期间每日的饲喂时间均为7:00和16:30。将饲料加入一定比例的水制作成团状饲料, 投饲量为鱼体重的3%—5%, 每天记录各个缸的实际投喂量。投喂1h后捞取残饵, 烘干后称重。在实验结束时, 实验鱼饥饿24h后称量和记录每缸鱼的终末体重。

1.4 实验取样

在实验结束时, 每缸随机取15尾鱼用MS-222麻醉, 麻醉后随机取3尾在冰盘上解剖出肝脏, 后放入冻存管中经液氮急冻, 稍后转移到-80℃冰箱中保存, 用作抗氧化酶的测定。另外随机取3尾鱼进行解剖,

表1 饲料AFB₁水平对花鳗鲡幼鱼初始体重(IBW)、终末体重(FBW)、存活率(SR)、摄食率(FR)、特定生长率(SGR)和饲料效率(FE)的影响(平均值±标准误)*

Tab. 1 Effects of dietary AFB₁ on Initial Body Weight (IBW), Final Body Weight (FBW), Survival Rate (SR), Feeding Rate (FR), Specific Growth Rate (SGR), Feed Efficiency (FE) of juvenile marbled eel (Mean±SE) *

指标Index	AFB ₁ 添加量Supplemented AFB ₁ (μg/kg diet)			
	0	10	100	1000
初始体重IBW (g)	6.43±0.06	6.39±0.08	6.42±0.10	6.40±0.05
终末体重FBW (g)	11.5±0.2 ^a	11.8±0.4 ^a	10.7±0.4 ^a	8.0±0.5 ^b
存活率SR (%)	93.3±4.4 ^a	91.7±3.3 ^{ab}	90.0±2.9 ^{ab}	80.0±2.9 ^b
摄食率FR (%BW/d)	1.54±0.01 ^a	1.59±0.04 ^a	1.40±0.00 ^a	0.75±0.15 ^b
特定生长率SGR (%/d)	1.04±0.03 ^a	1.09±0.06 ^a	0.91±0.10 ^a	0.38±0.12 ^b
饲料效率FE (%)	65.7±1.8 ^a	66.4±1.7 ^a	63.2±6.5 ^{ab}	48.8±6.4 ^b

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 applies below

取肝脏用中性甲醛固定后采用HE染色法进行组织切片制作。剩余所有肝脏冷冻干燥后用于肝脏中AFB₁含量分析。每缸12尾鱼均在冰盘上解剖,取背部白肌进行冷冻干燥,用于测定肌肉中AFB₁含量。

1.5 样品的测定

本实验基础饲料中干物质、粗蛋白、粗脂肪和灰分的含量测定参照文献[26]的方法进行。饲料干物质在105℃下烘干至恒重,通过失重法测定。饲料粗蛋白含量使用凯氏定氮仪(Kjeltec8400, FOSS)测定。饲料粗脂肪含量使用索氏抽提仪(ST243, FOSS)进行测定。饲料样品在马福炉中550℃燃烧3h,以失重法测定灰分。

采用南京建成生物工程研究所的试剂盒测定肝脏中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)活性、谷胱甘肽S转移酶(GST)活性和丙二醛(MDA)含量。鱼体肝脏和肌肉AFB₁积累量采用ELISA法^[11, 23]进行测定(试剂盒购自北京百灵康源生物公司)。

1.6 数据处理

利用以下公式计算存活率、摄食率、饲料效率和特定生长率:

$$\text{存活率}(SR, \%) = 100 \times (\text{剩余尾数} / \text{初始尾数})$$

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

$$\text{饲料效率}(FE, \%) = 100 \times (W_2 - W_1) / I$$

$$\text{特定生长率}(SGR, \%/\text{d}) = 100 \times (\ln W_2 - \ln W_1) / t$$

式中, W_1 为平均初始体重(g), W_2 为平均终末体重(g), t 为实验天数(d), I 为摄食量(g)。实验数据使用SPSS Statistics 17.0进行统计分析。实验结果经一元方差分析(One-way ANOVA)后,用Duncan's 进行多重比较,当 $P < 0.05$ 时,为差异显著。

2 结果

2.1 饲料中AFB₁水平对花鳗鲡幼鱼存活和生长的影响

在整个实验过程中,各实验组花鳗鲡幼鱼均未表现出行为异常和体色变化。如表1所示,10与100 μg/kg毒素组花鳗鲡幼鱼的终末体重(FBM)、存活率(SR)、摄食率(FR)、特定生长率(SGR)、饲料效率(FE)均与对照组无显著性差异($P > 0.05$)。1000 μg/kg毒素组的FBW、SR、FR、SGR和FE均显著低于对照组($P < 0.05$)。

2.2 饲料AFB₁水平对花鳗鲡幼鱼抗氧化指标的影响

如表2所示,10 μg/kg毒素组花鳗鲡幼鱼肝脏的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、谷胱甘肽S转移酶

(GST)活性和丙二醛(MDA)含量均与对照组无显著性差异($P > 0.05$)。100 μg/kg毒素组花鳗鲡幼鱼肝脏的SOD、GSH-Px和GST活性均显著低于对照组($P < 0.05$),CAT活性和MDA含量均与对照组无显著差异($P > 0.05$)。与对照组相比,1000 μg/kg毒素组花鳗鲡幼鱼肝脏的SOD、CAT、GSH-Px和GST活性均显著降低($P < 0.05$),MDA含量显著升高($P < 0.05$)。

表2 饲料AFB₁水平对花鳗鲡幼鱼肝脏超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、谷胱甘肽S转移酶(GST)活性和丙二醛(MDA)含量的影响(平均值±标准误)

Tab. 2 Effects of dietary AFB₁ on liver activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione S-transferase (GST), and malondialdehyde (MDA) of juvenile marbled eel (Mean±SE)

指标Index	AFB ₁ 添加量Supplemented AFB ₁ (μg/kg diet)			
	0	10	100	1000
SOD (U/mg prot)	281.0±7.3 ^a	295.9±5.9 ^a	256.9±5.8 ^b	245.0±1.7 ^b
CAT (U/mg prot)	123.5±12.2 ^a	119.6±10.5 ^{ab}	118.8±9.3 ^{ab}	89.3±4.1 ^b
GSH-Px (U/mg prot)	372.7±15.6 ^a	389.5±13.6 ^a	283.7±7.3 ^b	262.1±14.9 ^b
GST (U/mg prot)	255.0±10.2 ^a	256.0±12.8 ^a	206.1±6.2 ^b	175.6±17.9 ^b
MDA (nmol / mg prot)	3.55±0.12 ^a	3.79±0.08 ^{ab}	3.69±0.25 ^{ab}	4.32±0.24 ^b

2.3 饲料中AFB₁水平对花鳗鲡幼鱼肝脏组织学的影响

肝脏组织学观察结果如图1所示,对照组花鳗鲡幼鱼的肝细胞排列整齐,细胞界限清晰,核大而圆,液泡较为丰富。10 μg/kg毒素组花鳗鲡幼鱼的肝细胞呈现出正常的均匀分布,与对照组肝脏细胞的大小、形状和排列方式均无明显差别。100 μg/kg毒素组花鳗鲡幼鱼的部分肝细胞形状不规则,细胞之间界限不清晰,部分区域出现了空泡化。1000 μg/kg毒素组花鳗鲡幼鱼的肝脏则观察到较严重的病理变化,肝细胞界限基本消失,细胞膜和细胞质溶解,细胞核呈多形;细胞空泡化明显增多,细胞核被挤到细胞一侧。

2.4 饲料AFB₁水平对花鳗鲡幼鱼肝脏和肌肉的AFB₁积累水平的影响

如表3所示,随着饲料中AFB₁水平的增加,花鳗鲡幼鱼肝脏和肌肉中AFB₁的含量均显著升高($P < 0.05$),各组间均存在显著差异($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 饲料中AFB₁水平对花鳗鲡幼鱼的存活和生长的影响

AFB₁会导致部分水生动物的行为异常,体表

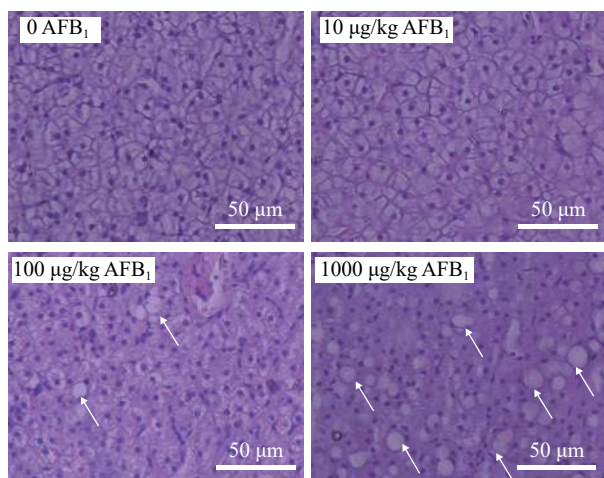


图1 饲料中AFB₁对花鳗鲡幼鱼肝脏组织学的影响(H&E, 标尺为50 µm)

Fig. 1 Liver of juvenile marbled eel fed with diets containing AFB₁ (H&E, Bar=50 µm)

箭头指示的为肝脏细胞的空泡化 Arrow indicated vacuolar degeneration of hepatocytes

黄化, 食欲下降及体重减轻, 甚至死亡率增高^[2]。喂食含AFB₁的饲料可引起银鲈(*Rhamdia quelen*)脑突触乙酰胆碱酯酶活性变化, 造成血脑屏障的紊乱和脑损伤, 这些可能是导致鱼类行为变化的部分原因^[27]。当日粮中AFB₁水平达到或超过59 µg/kg时, 草鱼出现体表变黄、尾鳍畸形和骨骼发育异常等现象^[14]。在本实验中, 摄食不同浓度AFB₁饲料的花鳗鲡均未出现明显的行为异常和体色的变化。尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)摄食10 mg/kg AFB₁的饲料8周后, 对其死亡率无显著影响^[24]。在饲料中添加25、50、100、500和1000 µg/kg AFB₁, 均不会对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的存活率造成负面影响, 但是显著影响增重率和特定增长率^[13]。奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus* ♀×*O. aureus* ♂)的摄食率和饲料中AFB₁浓度存在剂量效应, 摄食率随AFB₁浓度的升高而降低^[11]。尼罗罗非鱼摄入2 mg/kg AFB₁, 终末体重、增重率和饲料转化率分别比对照组降低了19.85%、24.18%和

表3 饲料中AFB₁水平对花鳗鲡幼鱼肝脏和肌肉AFB₁积累(µg/kg 湿重)的影响(平均值±标准误)

Tab. 3 Effects of dietary AFB₁ on AFB₁ accumulation (µg/kg wet weight) in liver and muscle of juvenile marbled eel (Mean±SE)

指标Index	AFB ₁ 添加量Supplemented AFB ₁ (µg/kg diet)			
	0	10	100	1000
肝脏AFB ₁ 积累量AFB ₁ accumulation in hepatopancreas	0.25±0.07 ^a	3.21±0.56 ^b	9.21±0.58 ^c	17.75±1.48 ^d
肌肉AFB ₁ 积累量AFB ₁ accumulation in muscle	0.13±0.07 ^a	1.20±0.16 ^b	3.49±0.27 ^c	5.98±0.18 ^d

34.21%^[28]。但斑点叉尾鲟(*Ictalurus punctatus*)摄入AFT12周, 对其摄食、生长和饲料效率均无显著影响^[29]。这些研究结果表明, 不同鱼类对AFB₁的耐受性存在较大的差别, 虹鳟等被证明是对AFB₁最敏感鱼类之一^[1, 2, 15, 22]。在本实验中, 当饲料中AFB₁≤100 µg/kg时花鳗鲡幼鱼的终末体重、存活率、摄食率、特定生长率和饲料效率均与对照组无显著性差异; 但当AFB₁达1000 µg/kg时, 以上指标均显著低于对照组。AFB₁对生长的负面影响可能是由于高剂量的AFB₁造成机体消化机能受损, 消化酶活性下降, 对糖类及脂肪等营养物质的吸收和利用降低, 影响了机体的生长发育^[5, 30]。

3.2 饲料中AFB₁水平对花鳗鲡幼鱼抗氧化能力的影响

需氧生物体内抗氧化的防御系统主要由一系列抗氧化酶构成, 其酶活性的高低在一定程度上反映了生物体的健康状况。肝脏中的抗氧化酶主要由超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶等构成, 抗氧化酶可清除或中和自由基和活性氧(ROS)^[31]。AFB₁经过细胞色素P450活化转化成的AFBO具有亲电性, 导致体内产生的大量自由基和ROS, 肝细胞自由基清除系统受损, 机体的抗氧化能力大大降低^[32]。ROS还可破坏细胞膜上的不饱和脂肪酸, 并引发脂质过氧化反应, 产生MDA、羟基、羰基及新的氧自由基^[1]。MDA的含量不仅可以反映出生物体体内脂质过氧化的程度, 而且间接地体现出机体细胞受损伤的程度^[5]。AFB₁可上调草鱼细胞内信号通路中的调节蛋白keap1a, 下调核转录因子Nrf2, 从而抑制SOD、CAT、GSH-Px和GST等抗氧化酶的基因表达和酶活力^[14]。AFB₁显著降低了罗非鱼体内GSH、SOD、GSH-Px和CAT的活性^[28]。饲喂含AFB₁的饲料后黄河鲤血清和肝脏SOD、CAT和GSH-Px活性均显著降低, MDA含量显著升高^[5]。GST在AFB₁的代谢过程中起着非常重要的作用, 可催化AFBO与GSH共轭生成水溶性化合物, 使AFB₁及其代谢物得以排出体外, 缓解AFB₁造成的毒性^[33]。凡纳滨对虾摄入5 mg/kg AFB₁后, 肝脏GST活性受到显著影响^[34]。在本实验中, 花鳗鲡幼鱼摄入1000 µg/kg AFB₁后, 肝脏SOD、CAT、GSH-Px和GST活性均显著降低, MDA含量显著升高, 表明AFB₁可显著影响花鳗鲡幼鱼抗氧化能力。该结果与王静^[35]的报道相似, AFB₁通过削弱机体的抗氧化能力, 使对虾的抗病能力减弱, 从而降低其对外界细菌的抵御性。

3.3 饲料中AFB₁水平对花鳗鲡幼鱼的肝脏组织学影响

AFB₁的主要靶器官是肝脏, 会引起肝脏功能

紊乱和损伤,表现为肝脏水肿,肝脏细胞受损,空泡化严重,炎症细胞增多^[2]。用15 mg/kg的AFB₁饲喂凡纳滨对虾12d会导致肝胰腺严重损伤,肌上皮层和肝胰腺上皮细胞分离;空泡细胞内脂肪过多,核固缩,细胞溶解,细胞坏死;基膜部分区域溶解,管腔星形结构消失,储存细胞萎缩或消失^[34]。尼罗罗非鱼摄入2.5 mg/kg AFB₁ 84d后肝胰腺内腺泡坏死,核固缩;肝脏出现较大规模坏死、淤血、充血和淋巴细胞浸润^[36]。大盖巨脂鲤(*Colossoma macropomum*)摄入1000 µg AFB₁/kg饲料后肝细胞空泡、坏死,细胞核萎缩^[37]。凡纳滨对虾摄入含38.1和54.9 µg/kg AFB₁的饲料56d后,其肝脏无明显病变;当饲料中AFB₁水平超过107.6 µg/kg时,对虾肝胰腺出现明显的萎缩和不规则的管状结构,储存细胞和分泌细胞减少^[13]。与以上研究结果不同,异育银鲫摄食500 µg AFB₁/kg饲料56d后肝脏未见明显的组织病理变化^[23]。在本实验中,饲料AFB₁含量为100 µg/kg时会引起花鳊幼鱼细胞界限不清晰和小部分细胞空泡化。随着AFB₁浓度的升高,肝脏损伤更为明显,出现严重的空泡样变性。上述结果表明,AFB₁对肝脏组织的损伤程度与毒素的剂量及受试动物的种类有关。

3.4 饲料AFB₁水平对花鳊幼鱼肝脏和肌肉AFB₁积累水平的影响

AFB₁进入动物体内后,部分会被转化成AFBO,或者通过其他代谢物形式积累在不同组织中^[1]。FDA规定食品中AFB₁的安全限量为5 µg/kg^[38]。尼罗罗非鱼摄入2000 µg/kg AFB₁后,全鱼鱼体AFB₁积累达到21.18 µg/kg^[28]。饲喂黄河鲤55 µg AFB₁/kg饲料30d后,肝胰腺中AFB₁积累量为5.52 µg/kg^[5]。大盖巨脂鲤摄入1000 µg AFB₁/kg饲料39d后,肌肉AFB₁含量为3.28 µg/kg^[37]。杂交鲟(*Acipenser ruthenus* ♀×*A. baerii* ♂)肝脏和肌肉中的AFB₁积累均随着饲料中AFB₁水平的升高而增加,且呈线性相关^[25]。草鱼摄食10、20、100和1000 µg/kg AFB₁84d后,其肌肉中均未检测出AFB₁,仅在饲喂5000 µg/kg AFB₁的草鱼肌肉中检测出1.21 µg/kg AFB₁^[39]。凡纳滨对虾摄入0、25、50、100和1000 µg/kg AFB₁ 56d,肌肉中均未发现AFB₁残留^[13]。在本实验中,花鳊幼鱼肝脏和肌肉AFB₁积累随着饲料中AFB₁水平的增加而显著增加,在同一AFB₁水平下,肝脏中AFB₁的积累要高于肌肉中;当饲料中AFB₁达100 µg/kg时,肝脏AFB₁积累量高于FDA食品安全限定标准;当饲料中AFB₁达1000 µg/kg时,花鳊幼鱼肝脏和肌肉中AFB₁积累量均超过FDA食品安全限定标准。以上研究结果说明,不同

水产动物对AFB₁的代谢率可能存在较大差别。总体上说,大多数的动物肌肉中AFB₁的积累量要比肝脏中低,肝胆系统是AFB₁及其代谢物积累和排泄的主要场所^[1, 2, 16]。

4 结论

花鳊幼鱼摄入AFB₁含量为10 µg/kg的饲料56d后,其存活率、摄食、生长、抗氧化指标和肝脏组织学均未受到显著影响。饲料中AFB₁含量≥100 µg/kg时会损伤花鳊幼鱼的抗氧化能力和肝脏组织。1000 µg/kg毒素组花鳊幼鱼肝脏和肌肉中AFB₁积累量均超过FDA食品安全限定标准。

参考文献:

- [1] Deng S X. The responses of acute and chronic toxicity of aflatoxin B₁ (AFB₁) in the tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀×*O. aureus* ♂) [D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2010: 2. [邓世喜. 奥尼罗非鱼对黄曲霉毒素B₁(AFB₁)急性、慢性中毒的反应[D]. 广州: 中山大学, 2010: 2.]
- [2] 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(1): 99-130.
- [3] Chen H Y, Rawlings R. The truth of mycotoxin contamination of feed in Asia region [J]. *China Poultry*, 2018, 30(16): 33-35.
- [4] Wang G Q, Liu Y D, Duan S H. Mycotoxin contamination and investigation of feed and feedstuff in the first half of 2019 [J]. *Swine Production*, 2019(6): 17-19. [王国强, 刘耀东, 段胜和. 2019年上半年饲料及饲料原料霉菌毒素污染及调查报告[J]. 养猪, 2019(6): 17-19.]
- [5] Wang D C. Effects of *Bacillus subtilis* on physiological and biochemical indexes of the Yellow River carp fed with containing AFB₁ moldy feed [D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2015: 1-2. [王大才. 枯草芽孢杆菌制剂对饲喂含AFB₁发霉饲料黄河鲤生理生化指标的影响[D]. 郑州: 河南工业大学, 2015: 1-2.]
- [6] Kowalska A, Walkiewicz K, Kozieł P, et al. Aflatoxins: characteristics and impact on human health [J]. *Postpy Higieny i Medycyny Dowiadczalnej*, 2017, 71(1): 315-327.
- [7] NY5072-2002, Pollution-free food. Fishery limit with the feed safety [S]. Beijing: Ministry of Agriculture of the PRC, 2002.09.01. [NY5072-2002, 无公害食品渔用配合饲料安全限量[S]. 北京: 中华人民共和国农业部, 2002.09.01.]
- [8] 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.
- [9] 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**(1): 49-60.
- [10] Sahoo P K, Mukherjee S C, Jain A K, *et al.* Histopathological and electron microscopic studies of gills and opisthonephros of rohu, *Labeo rohita* to acute and subchronic aflatoxin B₁ toxicity [J]. *Asian Fisheries Science*, 2003, **16**(3-4): 257-268.
- [11] 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**(3-4): 233-240.
- [12] Rui A G, Tu D C, Nguyen N T, *et al.* Aflatoxin B₁ (AFB₁) reduces growth performance, physiological response, and disease resistance in Tra catfish (*Pangasius hypophthalmus*) [J]. *Aquaculture International*, 2018, **26**(3): 921-936.
- [13] Zeng S L, Long W Q, Tian L X, *et al.* Effects of dietary aflatoxin B₁ on growth performance, body composition, haematological parameters and histopathology of juvenile Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2016, **22**(5): 1152-1159.
- [14] Zeng Z Z, Jiang W D, Wu P, *et al.* Dietary aflatoxin B₁ decreases growth performance and damages the structural integrity of immune organs in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Aquaculture*, 2019(500): 1-17.
- [15] Ottinger C A, Kaattari S L. Sensitivity of rainbow trout leucocytes to aflatoxin B₁ [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1998(8): 515-530.
- [16] Huang Y, Han D, Zhu X M, *et al.* Response and recovery of gibel carp from subchronic oral administration of aflatoxin B₁ [J]. *Aquaculture*, 2011, **319**(1-2): 89-97.
- [17] Fan Y, Liu L, Zhao L, *et al.* Influence of *Bacillus subtilis* ANSB060 on growth, digestive enzyme and aflatoxin residue in Yellow River carp fed diets contaminated with aflatoxin B₁ [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2018(113): 108-114.
- [18] He M, Liu L P, Qu H C, *et al.* Effects of dietary taurine on growth performance and digestive enzyme activity of *Anguilla marmorata* [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2017, **26**(2): 227-234. [何明, 刘利平, 曲恒超, 等. 牛磺酸对花鳗鲡生长和消化酶活力的影响 [J]. 上海海洋大学学报, 2017, **26**(2): 227-234.]
- [19] Jia X Q. The analysis of relationship between intestinal microbiota structure and growth speed of *Anguilla marmorata* [D]. Xiamen: Jimei University, 2017: 1. [贾雪卿. 花鳗鲡肠道菌群结构与生长速度相互关系的研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2017: 1.]
- [20] Ma D Y, Shi Y, Chen X H, *et al.* Preliminary study on recommendation level of trace elements in eel diet [J]. *Feed Research*, 2019(5): 73-75. [马德英, 史叶, 陈学豪, 等. 鳗鲡饲料中微量元素推荐量初探 [J]. 饲料研究, 2019(5): 73-75.]
- [21] Lin Q. Analysis of eel compound feed quality [J]. *Fujian Agriculture Science and Technology*, 2020(6): 70-71. [林虬. 鳗鲡配合饲料品质分析 [J]. 福建农业科技, 2020(6): 70-71.]
- [22] 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**(3-4): 355-358.
- [23] Huang Y, Zhu X M, Han D, *et al.* Growth and aflatoxin B₁ accumulation of gibel carp adult fed with diets of different levels of aflatoxin B₁ [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, **36**(5): 817-825. [黄莹, 朱晓鸣, 韩冬, 等. 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 [J]. 水生生物学报, 2012, **36**(5): 817-825.]
- [24] 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**(1-4): 311-319.
- [25] Raghavan P R, Zhu X, Lei W, *et al.* Low levels of aflatoxin B₁ could cause mortalities in juvenile hybrid sturgeon, *Acipenser ruthenus* ♀ × *A. baerii* ♂ [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2011, **17**(2): 39-47.
- [26] Association of Official Analytical Chemists. Animal Feed [M]. Williams S (Eds.), Official Methods of Analysis, 14th edn AOAC, Inc., Arlington, VA, Washington, DC, 1984: 152-161.
- [27] Baldissera M D, Souza C F, Zeppenfeld C C, *et al.* Modulation of acetylcholinesterase activity exerts anti-inflammatory effect in spleen and immune cells of fish fed with a diet contaminated by aflatoxin B₁ [J]. *Aquaculture*, 2019, **502**(15): 8-11.
- [28] Ayyat M S, Ayyat A M N, Al-Sagheer A A, *et al.* Effect of some safe feed additives on growth performance, blood biochemistry and bioaccumulation of aflatoxin residues of Nile tilapia fed aflatoxin B₁ contaminated diet [J]. *Aquaculture*, 2018(495): 27-34.
- [29] 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.
- [30] Mohamed M, Abdel-Daim, Mahmoud A O, *et al.* Effects of fucoidan on the hematic indicators and antioxidative responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed-diets contaminated with aflatoxin B₁ [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020, **27**(11): 12579-12586.
- [31] 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 [J]. 中国兽医学报, 2007, **27**(5): 733-736.]
- [32] Eaton D L, Bammler T K. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology [J]. *Toxicological Sciences*, 1999, **49**(2): 156-164.
- [33] Wang H. Curcumin Alleviates Aflatoxin B₁-induced Subacute Liver Injury via Up-regulating Nrf2 and GST Ex-

- pression [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2018: 3. [王鹤. 姜黄素通过上调Nrf2-GST表达干预AFB₁诱导的肉鸡亚急性肝损伤 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2018: 3.]
- [34] Wang Y L, Wang B J, Liu M, *et al.* Aflatoxin B₁ (AFB₁) induced dysregulation of intestinal microbiota and damage of antioxidant system in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Aquaculture*, 2018, **495**(1): 940-947.
- [35] Wang J. Toxic effects of aflatoxin B₁ on growth performance, biochemical and hepatopancreas microstructure of *Litopenaeus vannamei* [D]. Tianjin: Agriculture University of Hebei, 2014: 26. [王静. 饲料中黄曲霉毒素B₁对凡纳滨对虾生长、肝胰腺和血淋巴生化指标及肝胰腺显微结构的影响 [D]. 天津: 河北农业大学, 2014: 26.]
- [36] Mohammed A E N, Nahla E M, Ismael S A, *et al.* Ameliorative effect of diets supplemented with rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on aflatoxin B₁ toxicity in terms of the performance, liver histopathology, immunity and antioxidant activity of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Aquaculture*, 2019(511): 734264.
- [37] Nunes E M C G, Pereira M M G, Costa A P R, *et al.* Effects of aflatoxin B₁ on performance and health of tambaqui fingerlings (*Colossoma macropomum*) [J]. *International Aquatic Research*, 2019(11): 73-83.
- [38] 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.
- [39] Huang Y, Yao Y, Zhu X M, *et al.* Effects of aflatoxin b₁ on growth and tissue accumulation of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, **43**(4): 723-730. [黄莹, 姚远, 朱晓鸣, 等. 饲喂不同浓度黄曲霉毒素B₁饲料对草鱼幼鱼生长和毒素积累的影响 [J]. 水生生物学报, 2019, **43**(4): 723-730.]

EFFECTS OF DIETARY AFLATOXIN B₁ ON GROWTH, ANTIOXIDANT CAPACITY AND TISSUE ACCUMULATION OF JUVENILE MARBLED EEL (*ANGUILLA MARMORATA*)

HUANG Ying^{1,2}, HAN Jin-Gao², ZHU Xiao-Ming³, ZHAO Yi-Xin²,
WANG Shou-Kun², HU Zhi-Hao² and CHEN Xin-Hua^{1,2}

(1. Key Laboratory of Marine Biotechnology of Fujian Province, Institute of Oceanology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. China College of Animal Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 3. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: To evaluate the effects of dietary aflatoxin B₁ (AFB₁) on growth performance, antioxidant capacity, histological changes and accumulation in juvenile marbled eel (*Anguilla marmorata*), triplicate groups of marbled eel with initial body weight of [(6.41±0.10) g] were fed with four diets containing 0, 10, 100 and 1000 µg/kg AFB₁ for a 56-day trial. No unusual behavior or external changes were observed in fish fed diets containing AFB₁. Significant lower survival rate, Final Body Weight (FBW), Feeding Rate (FR), Specific Growth Rate (SGR) and Feed Efficiency (FE) were observed in 1000 µg/kg AFB₁ group, while no significant differences were found among other groups. There were no significant differences in activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione S-transferase (GST), and malondialdehyde (MDA) in liver between the control and 10 µg/kg AFB₁ diet group. AFB₁ above 100 µg/kg significantly impacted activities of liver SOD, GSH-Px and GST. No significant histological lesions in liver were identified under the microscope in the control and 10 µg/kg AFB₁ diet groups. Severe vacuolar degeneration of hepatocytes was found in 1000 µg/kg AFB₁ group. AFB₁ accumulation in liver and muscle significantly increased with increased dietary AFB₁ levels, with 17.75 and 5.98 µg/kg in 1000 µg/kg AFB₁ group, respectively, which are above the safety limitation of 5 µg/kg as proposed by FDA. These results indicate that 10 µg/kg AFB₁ is the safe level in juvenile marbled eel diet.

Key words: Aflatoxin B₁; Juvenile marbled eel; Growth; Antioxidant capacity; Liver; Toxin accumulation