

doi: 10.7541/2019.085

## 饲喂不同浓度黄曲霉毒素B<sub>1</sub>饲料对草鱼幼鱼生长和毒素积累的影响

黄莹<sup>1</sup> 姚远<sup>1</sup> 朱晓鸣<sup>2</sup> 王寿昆<sup>1</sup> 许伟华<sup>1</sup> 刘雨龙<sup>1</sup> 陈新华<sup>1,3</sup>

(1. 福建农林大学动物科学学院, 福州 350002; 2. 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; 3. 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)

**摘要:** 以含不同浓度黄曲霉毒素B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>)(0、10、20、100、1000和5000 μg/kg饲料)的6种等氮等能(32.96%蛋白质, 14.55 kJ/g能量)配合饲料饲喂平均初始体质量为(2.90±0.16) g草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)幼鱼84d, 探讨AFB<sub>1</sub>对草鱼幼鱼生长、肝脏和肾脏组织结构以及鱼体肌肉中的毒素积累的影响。实验分为6个实验组, 每组3个平行。结果表明, 在整个实验过程中各实验组幼鱼的行为均未表现出异常, 各组幼鱼的存活率、终末体重、摄食率、特定生长率、饲料效率、肝体比、脏体比均无显著差异。饲料AFB<sub>1</sub>水平对草鱼幼鱼血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(AKP)、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性均无显著影响。各毒素组和对照组肝脏、肾脏组织学观察中未发现病理变化。摄食AFB<sub>1</sub>≤1000 μg/kg的草鱼幼鱼肌肉中未检测出AFB<sub>1</sub>残留, 仅在5000 μg/kg实验组中检测出肌肉中含有(1.21±0.18) μg/kg的AFB<sub>1</sub>, 低于FDA食品安全限定标准。由此可见, 草鱼幼鱼至少可耐受AFB<sub>1</sub>含量达5000 μg/kg饲料(实测值: 4979.2 μg/kg饲料) 84d。

**关键词:** 黄曲霉毒素B<sub>1</sub>; 草鱼幼鱼; 生长; 肝脏; 肾脏; 毒素积累

**中图分类号:** S965.1      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-3207(2019)04-0723-08

随着鱼粉资源日趋紧张, 鱼粉价格不断上涨。为了降低饲料生产成本, 水产饲料中多使用植物性蛋白, 如大豆、玉米蛋白粉等, 特别是在热带和亚热带地区, 这些饲料原料和饲料成品在加工、运输、保存过程中管理不当容易造成黄曲霉毒素(AFT)的污染<sup>[1]</sup>。AFT是霉菌次生代谢过程中产生的一类具有相似结构的有毒产物, 拥有1个糖酸味喃和1个氧杂萘邻酮(香豆素)结构<sup>[2]</sup>。黄曲霉(*Aspergillus flavus*)和寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*)是主要产生AFT的真菌, 在潮湿或阴雨天气的情况下, 极易导致上述2种真菌大量繁殖并产生AFT。曲霉菌通过空气、土壤或昆虫等途径传播到农作物和饲料储藏处, 在适宜的环境中繁殖并产生多种AFT, 最常见的有黄曲霉毒素B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>)、黄曲霉毒

素B<sub>2</sub>(AFB<sub>2</sub>)、黄曲霉毒素G<sub>1</sub>(AFG<sub>1</sub>)和黄曲霉毒素G<sub>2</sub>(AFG<sub>2</sub>), 其中黄曲霉毒素B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>)具免疫毒性、肝毒性和基因毒性, 可引起多种疾病的发生<sup>[3]</sup>。

国内外有关AFB<sub>1</sub>对水产动物影响的研究, 主要集中于尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)<sup>[4-7]</sup>、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[8, 9]</sup>、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)<sup>[10, 11]</sup>、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)<sup>[12]</sup>、南亚野鲮(*Labeo rohita*)<sup>[13]</sup>等种类。尼罗罗非鱼摄入含AFB<sub>1</sub>的饲料10周后, 生长减缓, 死亡率升高<sup>[14]</sup>。用含不同浓度的AFB<sub>1</sub>饲料饲喂异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)成鱼24周, 各毒素处理组鱼体生长和饲料利用较对照组无显著差异, 但对其生殖功能有一定影响<sup>[15]</sup>。不同水产动物对AFB<sub>1</sub>的敏感性差别很大, 此外AFB<sub>1</sub>毒性的大小还

收稿日期: 2018-08-31; 修订日期: 2019-02-27

基金项目: 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); 福州市科技局市校合作项目(2017-G-103); 福建省教育厅产学研项目(JK2016013)资助 [Supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (2016J01093); Fund Project in State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology (2014FB01); Cooperation Project of Fuzhou Science and Technology Department (2017-G-103); Combination of production and research Foundation of Fujian Education Department (JK2016013)]

作者简介: 黄莹(1982—), 女, 福建福州人; 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

受到毒素浓度、暴露时间、年龄、性别等因素的影响<sup>[1, 4, 5, 8, 9]</sup>。AFB<sub>1</sub>污染不仅会造成水产动物生长性能降低, 免疫抑制, 肝脏能损伤, 而且会积累在水产动物的体组织中, 随食物链在生态系统中进一步传播, 有可能威胁到人类的健康。

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)为我国传统的四大家鱼之一, 隶属于鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae), 雅罗鱼亚科(Leuciscinae)、草鱼属(*Ctenopharyngodon*), 为我国养殖产量最大的淡水养殖鱼类, 其配合饲料生产上多选用植物原料作其蛋白源。同时在我国南方渔民多习惯在塘头储存饲料, 而在高温、高湿的环境下, 原料及饲料感染黄曲霉的可能性极大, 这进一步提高了草鱼发生AFT中毒的概率。以往有关AFB<sub>1</sub>对水产动物的报道多集中于对水生动物急性毒性的研究, 研究方法多采用腹腔注射、灌喂等方式, 关于摄食途径导致亚慢性致毒的研究相对较少<sup>[4, 13]</sup>。但在实际生产中水产动物暴露于AFB<sub>1</sub>的方式主要是通过摄食被毒素污染的谷物和饲料, 因此, 相对于急性暴露, 研究动物长期摄入含AFB<sub>1</sub>的饲料, 更接近天然状态的AFB<sub>1</sub>摄入途径。迄今为止, 有关AFT在水产养殖动物中的代谢机理和毒理学研究尚不完整, 也仅涉及少数品种<sup>[5, 8, 12]</sup>。关于草鱼AFB<sub>1</sub>的亚慢性中毒的研究鲜见报道。AFB<sub>1</sub>的毒性大小与受试动物的生长阶段相关, 有报道表明鱼苗阶段比成鱼更易发生AFT中毒<sup>[16]</sup>。本论文采用草鱼幼鱼为实验对象, 研究不同浓度AFB<sub>1</sub>对草鱼幼鱼的生长、饲料利用、肝脏和肾脏组织学以及肌肉毒素残留的影响, 评估饲料中的AFB<sub>1</sub>对草鱼养殖和食品安全的潜在隐患。

## 1 材料与方法

### 1.1 养殖系统

微流水养殖系统由18个圆形塑料(pp)养殖桶(直径80 cm, 高70 cm, 水体体积为180 L/缸)组成, 每缸水流速度0.6 L/min。每天测2次气温和水温, 每2周检测水体溶氧和氨氮。实验期间, 水温为22—28℃; 饲养用水为经曝气的自来水, 保持水体中的溶解氧含量在6 mg/L以上, 氨氮范围为0.2—0.4 mg/L, pH为6.8—7.0。光照周期12L:12D, 光照周期为8:30到20:30。

### 1.2 实验饲料及实验设计

设置了不同浓度梯度AFB<sub>1</sub>(0、10、20、100、1000和5000 μg/kg)的6种等氮等能(32.96%蛋白质, 14.55 kJ/g能量)饲料(表1)。其中, 蛋白源为白鱼粉和酪蛋白。

在各实验组中, 通过酶联免疫法测得饲料中AFB<sub>1</sub>含量分别为0.8、11.6、20.3、94.9、955.7和4979.2 μg/kg, AFB<sub>1</sub>浓度的设计参考关于AFB<sub>1</sub>在水产动物的研究报道<sup>[4, 5, 15]</sup>。AFB<sub>1</sub>纯品购于美国Sigma公司, 将其溶于大豆油制成1000 μg/mL的母液, 按照设计浓度添加相应量到各组饲料中。饲料制成直径3 mm颗粒, 于60℃恒温干燥箱中烘干后置于-20℃冰箱备用。

### 1.3 实验鱼与饲养实验

实验草鱼幼鱼来自福州市闽侯县南屿汤湖生态养殖场。实验鱼在室内循环水养殖系统中暂养2周后转入实验系统驯养2周, 暂养和驯化阶段均投喂对照组饲料(表1)。在实验开始时, 实验鱼饥饿24h, 选择健康、规格较为一致的草鱼幼鱼(平均体重2.90 g)360尾, 随机放入18个鱼缸中, 分为6个实验组, 每组3个平行, 每缸20尾, 进行为期84d的饲养实验。暂养期间和实验期间均于每日9:30与16:00分别连续投喂饲料, 达到表观饱食为止。在实验结束时, 将实验鱼饥饿24h, 称量和记

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 experiment diets (% in dry matter)

原料Ingredient	含量Content (%)
白鱼粉White fish meal	25.00
国产酪蛋白Domestic casein	16.50
鱼油Fish oil	3.00
玉米淀粉Corn starch	25.75
纤维素Cellulose	21.19
维生素预混物Vitamin premix <sup>1</sup>	0.45
胆碱Choline	0.11
矿物盐预混物Mineral premix <sup>2</sup>	5.00
海藻酸钠Sodium alginate	1.00
羧甲基纤维素Carboxymethyl cellulose	2.00
三氧化二钇Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.50
饲料化学成分Chemical composition (% in dry matter)	
粗蛋白Crude protein	32.96
粗脂肪Crude lipid	5.30
能量Energy (kJ/g)	14.55

注: 1. 维生素预混物Vitamin premix (mg/kg diet): 维生素B<sub>1</sub> Thiamin, 20; 维生素B<sub>2</sub> Riboflavin, 20; 烟酸Niacin, 100; 维生素B<sub>6</sub> Pyridoxine, 20; 生物素Biotin, 0.1; 维生素B<sub>12</sub> Cyanocobalamin, 0.020; 叶酸Folic acid, 5; 泛酸钙Calcium pantothenate, 50; 肌醇Inositol, 100; 维生素C Ascorbic acid, 100; 维生素A Retinol, 1.1; 维生素D Vitamin D, 20; 维生素E Vitamin E, 50; 维生素K Vitamin K, 10; 玉米淀粉Corn starch, 645.2; 2. 矿物盐预混物Mineral premix (mg/kg diet): NaCl, 500; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 8155.6; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 16000.0; Ca(HPO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, 7650.6; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 12500.0; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2286.2; C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>CaO<sub>6</sub>·5H<sub>2</sub>O, 1750.0; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 61.4; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 178.0; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 15.5; CoSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.91; KI, 1.5; 玉米淀粉Corn starch, 753.7

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3尾草鱼幼鱼解剖取出肝胰脏和肾脏, 用中性甲醛固定, 采用HE染色做组织切片, 用作组织学观察; 每缸随机取7尾草鱼幼鱼在冰盘上解剖取背部白肌, 冷冻干燥后保存于-20℃用于肌肉AFB<sub>1</sub>含量测定。

#### 1.5 样品的测定

实验饲料的干物质、粗蛋白、粗脂肪、灰分的测定参照文献[17]的方法测定: 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。

血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性的测定均采用南京建成生物工程研究所的测试盒。鱼体肌肉毒素残留采用ELISA法<sup>[4, 15]</sup>, 使用北京百灵康源生物公司的测试盒进行测定, 使用酶标仪(THERMO FISHER Multiskan FC)读数。

#### 1.6 数据处理

利用下列公式计算特定生长率、摄食率、饲料效率、肝体比和脏体比:

存活率 Survival rate (%) = 100% × (剩余尾数 / 初始尾数)

特定生长率 (SGR, %/d) = 100% × (LnW<sub>2</sub> - LnW<sub>1</sub>) / t

摄食率 (FR, %BW/d) = 100% × I / [(W<sub>1</sub> + W<sub>2</sub>) / 2] / t

饲料利用率 (FE, %) = 100% × (W<sub>2</sub> - W<sub>1</sub>) / I

肝体比 (HSI) = 100 × 肝脏重量(g) / 鱼体体重(g)

脏体比 (VSI) = 100 × 内脏重量(g) / 鱼体体重(g)

式中, W<sub>1</sub>为平均初始体重(g), W<sub>2</sub>为平均终末体重(g), t为实验时长(d), I为摄食量(g)。实验数据采

用统计软件SPSS Statistics 17.0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, 当P<0.05时为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 饲料中AFB<sub>1</sub>水平对草鱼幼鱼生长的影响

在整个实验过程中, 各组草鱼幼鱼行为均未表现出异常。各毒素组草鱼幼鱼外部形态和颜色较对照无显著差别。如表2所示, 各毒素组草鱼幼鱼的存活率均在80%以上, 与对照组无显著差异(P>0.05)。在实验结束时, 各组草鱼幼鱼终末体重无显著差异(P>0.05)。饲料AFB<sub>1</sub>水平对草鱼幼鱼摄食率(FR)、特定生长率(SGR)、饲料效率(FE)无显著影响(P>0.05)。

### 2.2 饲料AFB<sub>1</sub>水平对草鱼幼鱼生理指标的影响

如表3所示, 饲料AFB<sub>1</sub>水平对草鱼幼鱼血清谷丙转氨酶、谷草转氨酶、碱性磷酸酶、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性均无显著影响(P>0.05)。

### 2.3 饲料中AFB<sub>1</sub>水平对草鱼幼鱼内脏指数和组织学的影响

经过为期84d含不同浓度AFB<sub>1</sub>的饲料饲养后, 解剖发现, 草鱼幼鱼皮肤和各组织完整, 未观察到鳍、眼和内脏器官等外部形态的改变。各毒素组幼鱼的肝体比和脏体比与对照组相比无显著差异(P>0.05, 表4)。

肝脏组织切片观察结果如图1所示, 摄入不同浓度AFB<sub>1</sub>的草鱼幼鱼肝细胞均未出现异常, 细胞膜完整, 细胞质均匀、清晰, 细胞核形状较为规则, 细胞紧密连接。未见各类炎症细胞, 没有嗜酸性粒细胞聚集现象。图2为肾脏组织切片观察结果, 经不同AFB<sub>1</sub>浓度处理的草鱼幼鱼肾脏组织未出现异常, 组织细胞边界清晰, 肾小管与周围组织相连, 未出现萎缩、变形等病理变化, 各毒素组草鱼幼鱼肾

表2 饲料AFB<sub>1</sub>水平对草鱼幼鱼初始体重(IBW)、终末体重(FBW)、存活率、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. 2 Effects of dietary AFB<sub>1</sub> on initial body weight (IBW), final body weight (FBW), survival rate, feeding rate (FR), specific growth rate (SGR), feed efficiency (FE) of juvenile grass carp (Mean±SE)

AFB <sub>1</sub> 添加量 Supplemented AFB <sub>1</sub> (μg/kg diet)	初始体重 IBW (g)	终末体重 FBW (g)	存活率 Survival rate (%)	摄食率 FR (%BW/d)	特定生长率 SGR (%/d)	饲料效率 FE (%)
0	2.90±0.20	22.97±0.57	86.7±4.4	2.89±0.02	2.46±0.07	63.8±0.5
10	2.90±0.10	24.53±1.59	87.0±7.6	2.81±0.14	2.54±0.06	66.9±3.8
20	2.90±0.20	24.73±2.73	88.4±2.5	2.85±0.22	2.56±0.06	66.5±5.9
100	2.90±0.26	23.47±0.85	84.1±2.5	2.83±0.12	2.49±0.07	65.7±2.8
1000	2.90±0.20	24.03±1.46	84.1±6.6	2.87±0.08	2.52±0.06	65.1±1.7
5000	2.93±0.11	25.27±1.90	87.0±4.4	2.83±0.12	2.57±0.13	66.7±3.9

表3 饲料AFB<sub>1</sub>水平对草鱼幼鱼血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)和碱性磷酸酶(ALP)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性的影响(平均值±标准误)

Tab. 3 Effects of dietary AFB<sub>1</sub> on serum activities of glutamic-pyruvic transaminase (ALT), glutamic-oxalacetic transaminase (AST), alkaline phosphatase (ALP), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GSH-Px) of juvenile grass carp (Mean± SE)

AFB <sub>1</sub> 添加量 Supplemented AFB <sub>1</sub> (μg/kg diet)	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	SOD (U/L)	GSH-Px (U/L)
0	12.5±0.4	30.3±2.3	5.36±0.79	169.9±19.5	269.4±9.4
10	11.8±1.1	28.3±4.8	5.75±0.85	188.6±11.0	266.8±13.3
20	11.9±1.0	29.7±4.0	5.52±0.56	162.5±24.2	283.3±11.9
100	12.4±1.7	28.1±3.5	5.71±0.64	169.6±21.0	265.6±12.7
1000	13.1±0.6	28.3±2.7	5.69±1.25	171.9±10.4	274.9±9.6
5000	11.8±0.9	28.4±1.8	5.60±0.62	165.2±13.2	267.0±8.1

表4 饲料中AFB<sub>1</sub>水平对草鱼幼鱼肝体比(HSI)、脏体比(VSI)的影响(平均值±标准误)

Tab. 4 Effects of dietary AFB<sub>1</sub> on hepatosomatic index (HSI) and viscera index (VSI) of juvenile grass carp (Mean ± SE)

AFB <sub>1</sub> 添加量 Supplemented AFB <sub>1</sub> (μg/kg diet)	肝体比 HSI	脏体比 VSI
0	1.80±0.04	8.27±0.47
10	1.77±0.10	7.57±0.75
20	1.76±0.07	7.73±0.99
100	1.76±0.08	7.63±0.40
1000	1.72±0.11	7.43±0.75
5000	1.73±0.19	7.25±0.33

脏组织结构与对照组无显著差异。

## 2.4 饲料AFB<sub>1</sub>水平对草鱼幼鱼肌肉的AFB<sub>1</sub>积累水平的影响

在实验结束时,草鱼幼鱼肌肉中AFB<sub>1</sub>的残留量如表5所示。摄食AFB<sub>1</sub>≤1000 μg/kg的草鱼幼鱼肌肉中未检测出AFB<sub>1</sub>残留,仅在5000 μg/kg实验组中检测出肌肉中含有(1.21±0.18) μg/kg的AFB<sub>1</sub>。

## 3 讨论

### 3.1 饲料中AFB<sub>1</sub>水平对草鱼幼鱼存活率和生长的影响

AFB<sub>1</sub>会引起水产动物行为异常、体表黄化、食欲降低,长期食用或暴露在AFB<sub>1</sub>污染中还会表现出致癌、致畸、致突变等基因毒性,造成动物死亡<sup>[4,18-20]</sup>。凡纳滨对虾摄入AFB<sub>1</sub>含量为1500 μg/kg的饲料后成活率显著下降<sup>[21]</sup>。罗非鱼摄食AFB<sub>1</sub>含量为10 mg/kg的饲料对死亡率无显著影响<sup>[5]</sup>。异育银鲫摄食1000 μg/kg AFB<sub>1</sub>后存活率与对照组无显著差异<sup>[1]</sup>。在本实验中,草鱼幼鱼摄入AFB<sub>1</sub>达5000 μg/kg的饲料对存活率无显著影响,形态正常、鱼体健康,表明草鱼幼鱼对AFB<sub>1</sub>的耐受性较强。

尼罗罗非鱼<sup>[14]</sup>、斑节对虾(*Penaeus monodon* Fabricius)<sup>[22]</sup>摄食AFB<sub>1</sub>后表现为增重率降低;沟鲈<sup>[19]</sup>

和杂交鲟(*Acipenser ruthenus* ♀×*A. baerii* ♂)<sup>[23]</sup>摄食AFB<sub>1</sub>后摄食率下降。罗非鱼摄食AFB<sub>1</sub>达245 μg/kg时饲料效率显著降低,饲料效率降低与饲料中AFB<sub>1</sub>含量存在剂量效应<sup>[4]</sup>。在本实验中,各毒素组草鱼幼鱼摄食率、特定生长率、饲料效率均未显著受到显著影响,表明不同的鱼类在AFB<sub>1</sub>的耐受性上差别很大。

### 3.2 饲料中AFB<sub>1</sub>水平对草鱼幼鱼肝功能指标和抗氧化能力的影响

肝脏被认为是AFB<sub>1</sub>的主要作用器官。AFB<sub>1</sub>在肝脏中首先经细胞色素P450氧化酶代谢转化为黄曲霉毒醇(AFL)等,而黄曲霉毒醇又转化为AFB<sub>1</sub>-8,9-环氧化物(AFBO),随后与鸟嘌呤结合,形成一系列的加成物导致可遗传的恶性肿瘤基因<sup>[24]</sup>。生物体血清中的AST和ALT是医学临床上肝功能检查的最为主要的2种指标,当肝脏受损,细胞膜的通透性增大,存在于肝细胞浆ALT和AST进入血液内,血清中的ALT和AST的活性升高<sup>[1,4,11]</sup>。凡纳滨对虾摄入AFB<sub>1</sub>后ALT和AST活力显著高于对照组<sup>[25]</sup>。碱性磷酸酶是肝脏中重要的解毒酶,也是肝脏受损的评价标准之一。斑节对虾摄食AFB<sub>1</sub>后ALP活性显著升高<sup>[22]</sup>。在本实验中,草鱼幼鱼摄入不同浓度AFB<sub>1</sub>后血清ALT,AST和ALP均无显著变化,说明摄食AFB<sub>1</sub>含量≤5000 μg/kg饲料未对草鱼幼鱼肝功能造成损伤。

AFB<sub>1</sub>经过生物活化步骤转化成的AFBO具有亲电性,极易攻击酶蛋白分子上亲核的氮、氧和硫等杂原子,不但使酶蛋白失活,而且使体内产生的大量自由基和活性氧无法及时清除<sup>[26]</sup>。肝细胞自由基清除系统受损,机体的抗氧化能力大大降低,从而引起组织细胞的脂质过氧化,使细胞内活性氧防卫系统SOD、GSH-Px等活力下降<sup>[11]</sup>。在本实验中,摄食AFB<sub>1</sub>未对草鱼幼鱼的SOD和GSH-Px造成显著影响。

### 3.3 饲料中AFB<sub>1</sub>水平对草鱼幼鱼内脏指数和组织学的影响

AFT可引起动物肝脏纤维化、肝小叶中心坏死, 胆囊肿大、胆管上皮组织增生等。摄入AFB<sub>1</sub>会造成鱼体肝脏肿大, 肝体比显著升高<sup>[20]</sup>。在本实验中, 草鱼摄食AFB<sub>1</sub>达5000 μg/kg饲料对肝体比、脏体比无显著影响, 未造成胆囊肿大, 此结果与Huang等<sup>[15]</sup>对异育银鲫的报道相似。

虹鳟连续12个月摄入80 μg/kg的AFB<sub>1</sub>后, 肝脏表现为出现大量空泡并伴有炎症反应<sup>[27]</sup>。在肝脏受损的情况下, 虹鳟的原纤维细胞会转化为成肌纤维细胞, 以应对肝脏的损伤。罗非鱼摄入超过245 μg/kg超过20W后会引发肝脏疾病, 表现为肝形态异常, 肝脏空泡化严重, 伴有大量的嗜酸性粒细胞和炎症细胞<sup>[4]</sup>。凡纳滨对虾摄入AFB<sub>1</sub>后肝胰腺出现空泡的数量要远多于对照组, 随着AFB<sub>1</sub>浓度的升高, 肝细胞坏死程度越深, 空泡数量越多<sup>[11]</sup>。虹鳟摄食0.5 μg AFB<sub>1</sub>/kg饲料6个月后发现肝癌<sup>[8]</sup>。在本实验中, 草鱼幼鱼的肝胰腺组织未呈现纤维化病变, 肝脏细胞排列正常、紧密, 未见各类炎症细胞, 表明食用5000 μg/kg以下的AFB<sub>1</sub>不会对草鱼幼鱼肝胰腺造成病理损伤, 该结果与Han等<sup>[28]</sup>异育银鲫摄入AFB<sub>1</sub>后肝胰腺组织结构的影响的报道相似。这些不同的研究表明, AFB<sub>1</sub>诱导肝癌的易感性方

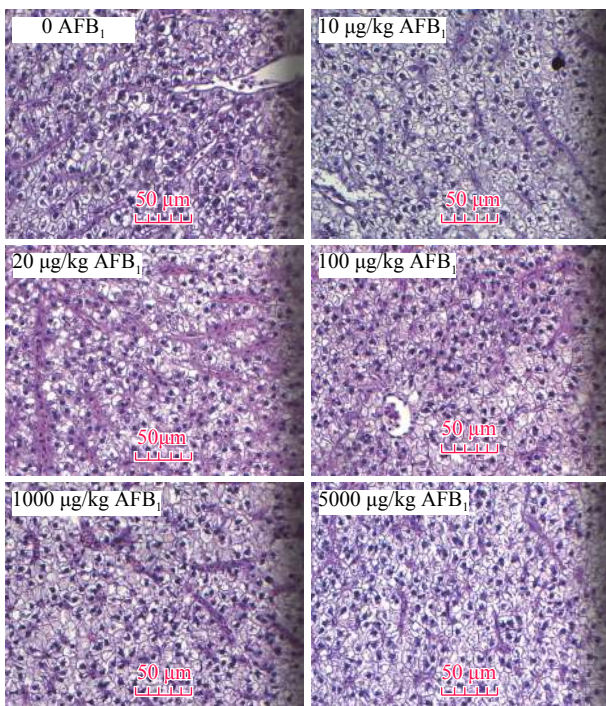


图1 饲料中AFB<sub>1</sub>对草鱼幼鱼肝脏组织学的影响(HE, 标尺为50 μm)

Fig. 1 Hepatopancreas of juvenile grass carp fed with diets containing AFB<sub>1</sub> (HE, Bar = 50 μm)

面, 生物种间存在着极大的差异。

鲤(*Cyprinus carpio*)摄食不同浓度(0.5、0.7、1.4 mg/kg) AFB<sub>1</sub>21d, 鲤肾脏上皮组织变性脱落、坏死, 肾小管和肾小囊腔扩张<sup>[29]</sup>。AFB<sub>1</sub>急性或者亚急性攻毒均会引起南亚野鲮肾脏肾曲小管上皮细胞变性、坏死, 肾小球萎缩<sup>[30]</sup>。低浓度(0.05 μg/kg) AFB<sub>1</sub>饲料饲养白鼠8周, 解剖观察其肾脏组织学变化, 染毒组的小鼠肾脏部分区域的近曲小管出现坏死和脱落现象; 电镜结果表明, 细胞质呈现空泡状态, 缺乏线粒体, 微绒毛间隔稀疏, 远曲小管出现细胞极性的消失和基底外侧内折<sup>[31]</sup>。在本实验中, 草鱼摄入5000 μg/kg以下的AFB<sub>1</sub>不会对肾脏组织造成损伤, 表明草鱼可能对AFB<sub>1</sub>有较强的代谢能力。一些鱼类对AFB<sub>1</sub>耐受力较强可能是由于AFB<sub>1</sub>在其体内较快地转化成AFL而非AFBO, 并且迅速被解毒酶作用而生成水溶性物质, 最后通过其胆汁、尿液等排出体外<sup>[12]</sup>。

### 3.4 饲料AFB<sub>1</sub>水平对草鱼幼鱼肌肉的AFB<sub>1</sub>积累水平的影响

用不同浓度AFB<sub>1</sub>饲料饲喂罗非鱼, 仅在肝脏中可以检测出AFB<sub>1</sub>的残留, 肌肉中未能测出<sup>[32]</sup>。用不同浓度AFB<sub>1</sub>饲喂异育银鲫24周, 各组异育银鲫的肌肉中测出的AFB<sub>1</sub>残留量小于5 μg/kg, 低于FDA规定的食品中AFB<sub>1</sub>含量限量标准<sup>[33]</sup>。海鲈

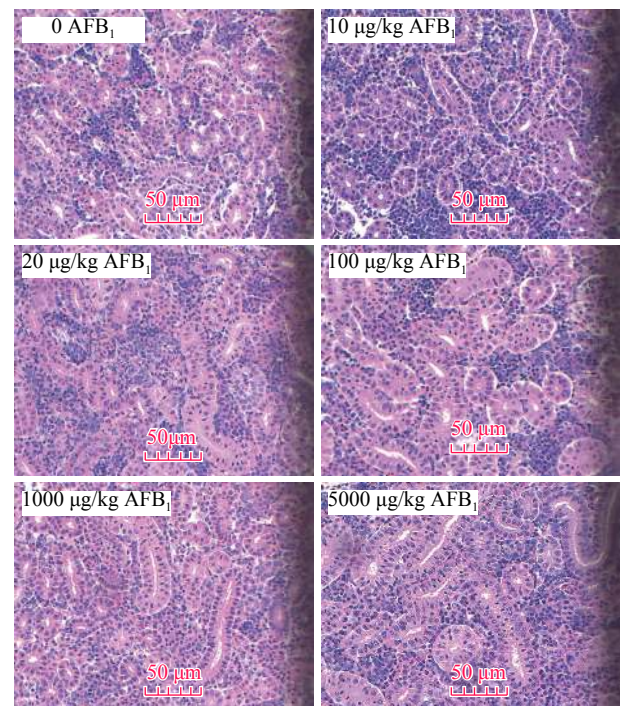


图2 饲料中AFB<sub>1</sub>对草鱼幼鱼肾脏组织学的影响(HE, 标尺为50 μm)

Fig. 2 Kidney of juvenile grass carp fed with diets containing AFB<sub>1</sub> (H&E, Bar = 50 μm)

表 5 饲料中AFB<sub>1</sub>水平对草鱼幼鱼肌肉AFB<sub>1</sub>积累(μg/kg湿重)的影响(平均值±标准误)

Tab. 5 Effects of dietary AFB<sub>1</sub> on AFB<sub>1</sub> accumulation (μg/kg wet weight) in muscle of juvenile grass carp (Mean±SE)

AFB <sub>1</sub> 添加量 Supplemented AFB <sub>1</sub> (μg/kg diet)	肌肉AFB <sub>1</sub> 积累量AFB <sub>1</sub> accumulation in muscle (μg/kg diet)
0	未检出
10	未检出
20	未检出
100	未检出
1000	未检出
5000	1.21±0.18

(*Dicentrarchus labrax* L.)饲喂含18 μg/kg AFB<sub>1</sub>饲料42d后,其肌肉中的AFB<sub>1</sub>达到4.25 μg/kg<sup>[34]</sup>。斑节对虾摄入AFB<sub>1</sub>第4周肌肉和头胸甲中有残留,且肌肉中含量多余头胸甲,而第6周开始AFB<sub>1</sub>的残留量开始下降,肌肉中AFB<sub>1</sub>含量极低,而头胸甲中的残留量也显著减小<sup>[22]</sup>。在本研究中,摄入AFB<sub>1</sub>浓度在1000 μg/kg以下的草鱼肌肉中未检测出AFB<sub>1</sub>残留,而5000 μg/kg组的残留量仅为1.21 μg/kg,低于FDA食品安全标准,此结果与王静等<sup>[11]</sup>对凡纳滨对虾的报道相似,摄入AFB<sub>1</sub>含量在2000 μg/kg以下的虾体肌肉中未检测出AFB<sub>1</sub>。

#### 4 结论

草鱼幼鱼摄入AFB<sub>1</sub>含量达4979.2 μg/kg饲料84d后,其生长、肝功能指标、内脏指数、肝胰脏和肾脏组织结构均未受到显著影响。肌肉的AFB<sub>1</sub>残留量低于FDA食品安全限定标准。

#### 参考文献:

- [1] Huang Y, Han D, Zhu X M, *et al.* Response and recovery of gibel carp from subchronic oral administration of aflatoxin B<sub>1</sub> [J]. *Aquaculture*, 2011, **319**(1—2): 89—97
- [2] Huang, Y, Z hu, X M, Han, D, *et al.* Growth and aflatoxin B<sub>1</sub> accumulation of gibel carp adult fed with diets of different levels of aflatoxin B<sub>1</sub> [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B<sub>1</sub>饲料对异育银鲫成鱼的生长和毒素积累的影响. 水生生物学报, 2012, **36**(5): 817—825]
- [3] Kowalska A, Walkiewicz K, Koziel P, *et al.* Aflatoxins: characteristics and impact on human health [J]. *Postpy Higieny I Medycyny Dowiadczalnej*, 2017, **71**(1): 315—327
- [4] Deng S X, Tian L X, Liu F J, *et al.* Toxic effects and residue of aflatoxin B<sub>1</sub> in tilapia (*Oreochromis niloticus*×*O. aureus*) [J]. *Aquaculture*, 2010, **307**(3—4): 233—240
- [5] Tuan N A, Grizzle J M, Lovell R T, *et al.* Growth and hepatic lesions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing aflatoxin B<sub>1</sub> [J]. *Aquaculture*, 2002, **212**(1—4): 311—319
- [6] Ngethe S, Horsberg T E, Mitema E, *et al.* Species differences in hepatic concentration of orally administered <sup>3</sup>H AFB<sub>1</sub> between rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Aquaculture*, 1993, **114**(3—4): 355—358
- [7] 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 B<sub>1</sub>, contaminated diet [J]. *Aquaculture*, 2018, **495**: 27—34
- [8] 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
- [9] Schoenhard G L, Hendricks J D, Nixon J E, *et al.* Aflatoxicol-induced hepatocellular carcinoma in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and the synergistic effects of cyclopropenoid fatty acids [J]. *Cancer Research*, 1981, **41**(3): 1011—1014
- [10] Yu Y Y, Niu J, Yin P, *et al.* Detoxification and immunoprotection of Zn (II)-curcumin in juvenile Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) feed with aflatoxin B<sub>1</sub> [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, **80**: 480—486
- [11] Wang J. Toxic effects of aflatoxin B<sub>1</sub> on growth performance, biochemical and hepatopancreas microstructure of *Litopenaeus vannamei* [D]. Thesis for Master of Science. Agriculture University of Hebei, Baoding. 2014 [王静. 饲料中黄曲霉毒素B<sub>1</sub>对凡纳滨对虾生长、肝胰脏和血淋巴生化指标及肝胰脏显微结构的影响. 硕士毕业论文, 河北农业大学, 保定. 2014]
- [12] Plakas S M, Loveland P M, Bailey G S, *et al.* Tissue deposition and excretion of <sup>14</sup>C-labeled aflatoxin B<sub>1</sub> after oral administration in channel catfish [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 1991, **29**(12): 805—808
- [13] Sahoo P K, Mukherjee S C. Immunosuppressive effects of aflatoxin B<sub>1</sub> in Indian major carp (*Labeo rohita*) [J]. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*, 2001, **24**(3): 143—149
- [14] 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
- [15] Huang Y, Han D, Xiao X C, *et al.* Effect of dietary aflatoxin B<sub>1</sub> on growth, fecundity and tissue accumulation in gibel carp during the stage of gonad development [J]. *Aquaculture*, 2014, **428—429**(5): 236—242
- [16] Hendricks J D. Carcinogenicity of aflatoxins in nonmammalian organisms. In: Eaton D L, Groopman J D (Eds.) *Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance*. Academic Press, San Diego, 1994, 103—136
- [17] 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
- [18] Chávez-Sánchez M C, Martínez P C A., Osorio M I, *et al.* Pathological effects of feeding young *Oreochromis niloticus* diets supplemented with different levels of aflatoxin B<sub>1</sub> [J]. *Aquaculture*, 1994, **127**(1): 49—60
- [19] Jantrarotai W, Lovell, R T. Subchronic toxicity of dietary aflatoxin B<sub>1</sub> to channel catfish [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1990, **2**(4): 248—254
- [20] Rui A G, Tu D C, Nguyen N T, *et al.* Aflatoxin B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>) reduces growth performance, physiological response, and disease resistance in Tra catfish (*Pangasius hypophthalmus*) [J]. *Aquaculture International*, 2018, **26**(3): 921—936
- [21] Ostrowski-Meissner H, LeaMaster B, Duerr E, *et al.* Sensitivity of the Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, to aflatoxin B<sub>1</sub> [J]. *Aquaculture*, 1995, **131**(3—4): 155—164
- [22] Boonyaratpalin M, Supamattaya K, Verakunpiriya V, *et al.* Effects of aflatoxin B<sub>1</sub> 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
- [23] Raghavan P R, Zhu X M, Lei W, *et al.* Low levels of aflatoxin B<sub>1</sub> could cause mortalities in juvenile hybrid sturgeon, *Acipenser ruthenus* ♀×*A. baerii* ♂ [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2011, **17**(2): 39—47
- [24] Valsta L M, Hendricks J D, Bailey G S. The significance of glutathione conjugation for aflatoxin B<sub>1</sub> metabolism in rainbow trout and coho salmon [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 1988, **26**(2): 129—135
- [25] Zeng S L, Long W Q, Tian L X, *et al.* Effects of dietary aflatoxin B<sub>1</sub> on growth performance, body composition, haematological parameters and histopathology of juvenile Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2016, **22**(5): 1152—1159
- [26] 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]
- [27] Arana S, Alves V A F, Sabino M, *et al.* Immunohistochemical evidence for myofibroblast-like cells associated with liver injury induced by Aflatoxin B<sub>1</sub> in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Journal of Comparative Pathology*, 2014, **150**(2—3): 258—265
- [28] Han D, Xie S, Zhu X M, *et al.* Growth and hepatopancreas in gibel carp fed diets containing low levels of aflatoxin B<sub>1</sub> [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2009, **16**(4): 335—342
- [29] Shima S, Mahdi B, Behzad N H, *et al.* Histopathological study of common carp (*Cyprinus carpio*) fed aflatoxin-contaminated diets [J]. *International Journal of Aquatic Biology*, 2017, **5**(2): 63—70
- [30] 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 B<sub>1</sub> toxicity [J]. *Asian Fisheries Science*, 2003, **16**(3-4): 257—268
- [31] Wei W, Li R, He L, *et al.* Evaluation of toxicological impacts on Sprague-Dawley rat by successively low dose of aflatoxin B<sub>1</sub> [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2014, **94**(14): 3017—3022
- [32] Deng S X. The responses of acute and chronic toxicity of aflatoxin B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>) in the Tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂) [D]. Thesis for Master of Science. Sun Yat-sen University, Guangzhou. 2010 [邓世喜. 奥尼罗非鱼对黄曲霉毒素B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>)急性、慢性中毒的反应. 硕士学位论文, 中山大学, 广州. 2010]
- [33] FDA. 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
- [34] El-Sayed Y S, Khalil R H. Toxicity, biochemical effects and residue of aflatoxin B<sub>1</sub> in marine water-reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2009, **47**(7): 1606—1609

## EFFECTS OF AFLATOXIN B<sub>1</sub> ON GROWTH AND TISSUE ACCUMULATION OF JUVENILE GRASS CARP (*CTENOPHARYNGODON IDELLUS*)

HUANG Ying<sup>1</sup>, YAO Yuan<sup>1</sup>, ZHU Xiao-Ming<sup>2</sup>, WANG Shou-Kun<sup>1</sup>, XU Wei-Hua<sup>1</sup>,  
LIU Yu-Long<sup>1</sup> and CHEN Xin-Hua<sup>1,3</sup>

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

**Abstract:** A 84-day feeding trial was conducted to evaluate the effects of dietary aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) on growth, physiological responses, histological changes, and accumulation in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Triplicate groups of grass carp [(2.90±0.16) g] were fed with six semipurified diets formulated with isonitrogenous (crude protein: 32.96%), isocaloric (gross energy: 14.55 kJ/g) containing 0, 10, 20, 100, 1000 and 5000 µg/kg AFB<sub>1</sub>. AFB<sub>1</sub> did not significantly impact behavior, the survival rate, final body weight (FBW), feeding rate (*FR*), specific growth rate (*SGR*) or feed efficiency (*FE*). No significant differences were found in hepatosomatic index (*HSI*) and viscera index (*VSI*) among all groups. AFB<sub>1</sub> had no significant effect in activities of serum alanine aminotransferase (*ALT*), aspartate aminotransferase (*AST*), alkaline phosphatase (*ALP*), superoxide dismutase (*SOD*) and glutathione peroxidase (*GSH-Px*). No significant histological lesions in hepatopancreas and kidney were identified between the control and increasing AFB<sub>1</sub> treatments. No AFB<sub>1</sub> residue was detected in muscles when fish fed with AFB<sub>1</sub> up to 1000 µg/kg, however, tiny dose [(1.21±0.18) µg/kg] of AFB<sub>1</sub> were detected in muscles in the group with 5000 µg/kg AFB<sub>1</sub>, which was below the safety limitation of FDA. The results indicated that juvenile grass carp is a little susceptible species to AFB<sub>1</sub> exposure up to approximately 5000 µg/kg diet (determined level was 4979.2 µg/kg diet), at least for 84 days.

**Key words:** Aflatoxin B<sub>1</sub>; *Ctenopharyngodon idellus*; Growth; Liver; Kidney; Accumulation