

夹竹桃(*Nerium indicum*)皂甙对 鲫鱼(*Carassius auratus*)幼鱼的影响

王 芳, 戴灵鹏*, 郑祥河, 席启斐, 王 倩

(温州大学生命与环境科学学院, 浙江 温州 325035)

摘 要:为了评价夹竹桃皂甙对非靶标生物的潜在危害, 采用半静态法研究了不同浓度(0、5.89、20.12 mg·L⁻¹ 和 80.76 mg·L⁻¹)的夹竹桃皂甙对鲫鱼幼苗的死亡情况、特定生长率、糖原、蛋白质含量、SOD 酶活性和微核率的影响。结果表明, 当夹竹桃皂甙处理浓度 ≤ 20.12 mg·L⁻¹ 时, 处理组的鲫鱼在试验期间无死亡; 而在 80.76 mg·L⁻¹ 皂甙的处理下, 鲫鱼 5 d 后全部死亡。当皂甙染毒浓度达 20.12 mg·L⁻¹ 时, 随处理时间的增加, 特定生长率、糖原和蛋白质含量逐渐下降, 而 SOD 活性先上升后下降; 在清水中恢复饲养 7 d 后, 鲫鱼幼苗特定生长率和 SOD 活性受到的抑制作用逐渐减弱, 糖原和蛋白含量恢复至与对照组相比无显著差异。此外, 微核试验表明夹竹桃皂甙对鲫鱼幼苗的微核率无影响。研究结果表明, 夹竹桃皂甙对鲫鱼的毒性属低等毒性且未发现遗传毒性, 但高浓度的皂甙能影响鲫鱼幼鱼的正常生理代谢, 导致生长受到抑制, 严重时可致其死亡。

关键词:皂甙; 夹竹桃; 鲫鱼; 毒害效应

中图分类号:X503.225 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2011)08-1526-05

Effects of Cardiac Glycosides from *Nerium indicum* on Juvenile *Carassius auratus*

WANG Fang, DAI Ling-peng*, ZHENG Xiang-he, XI Qi-fei, WANG Qian

(School of Life and Environmental Science, Wenzhou University, Wenzhou 325035, China)

Abstract: To assess the potential toxicity of cardiac glycosides of *N. indicum* on non-target organism, the effects of different concentration of cardiac glycosides (0, 5.89, 20.12 mg·L⁻¹ and 80.76 mg·L⁻¹) on mortality, specific growth rate, glycogen and protein content, SOD activity as well as micronucleus rate of juvenile *C. auratus* were investigated during exposure for 14 d and its recovery response after 7 d by using semi-static test method. The results showed that fish did not die when the concentration of cardiac glycosides ≤ 20.12 mg·L⁻¹ during 14 d exposure periods. However, with 80.76 mg·L⁻¹, 100% of the fish died within 5 d. When cardiac glycosides concentration reach to 20.12 mg·L⁻¹, the specific growth rate, glycogen and protein contents decreased gradually while the SOD activity increased first and then decreased during the whole experiment. After a recovery period of 7 d, the inhibition of specific growth rate and SOD activity were weakened gradually and the glycogen and protein content were no significant difference between control and treatment group. In addition, the result of micronucleus test showed that cardiac glycosides did not significantly affect the micronucleus rate of juvenile *C. auratus*. These results suggested that cardiac glycosides was low toxicity and no genotoxicity found, which supports that the plant product is safe for use as a molluscicide for the control of harmful freshwater snails in the aquatic environment. However, higher concentration of cardiac glucosides seriously impaired the normal physiological metabolism, resulting in the growth inhibition of *C. auratus*, even caused fish death in the end.

Keywords: cardiac glycosides; *N. indicum*; *C. auratus*; toxic effects

植物源农药由于具有在环境中易降解、对人畜及非靶标生物毒性低且不易产生耐药性等优点, 成为新型农药研究的热点和前沿^[1-3]。夹竹桃(*Nerium indicum* Mill)是一种常见的栽培观赏植物, 也是一种毒物和

药用植物。夹竹桃粗提物具有较强的杀虫、抑菌和灭螺活性^[4-5]。前期研究结果表明, 夹竹桃叶部的活性成分皂甙对福寿螺具有很强的灭螺作用, 其 96 h 的 IC₅₀ 值与化学合成农药密达 72 h 的 IC₅₀ 值相当。

鲫鱼 (*Carassius auratus*) 是我国淡水生态系统中广泛分布并具代表性的经济鱼类之一, 也是比较理想的水生毒理学试验材料^[6-8]。本文以鲫鱼幼鱼为试验生物, 研究能有效杀灭福寿螺的夹竹桃皂甙剂量对鲫鱼幼苗的特定生长率及生理生化指标糖

收稿日期: 2011-01-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30800159); 温州市科技计划资助项目(S20080041)

作者简介: 王 芳(1990—), 女, 浙江温州人, 主要从事环境生物技术与生态毒理学研究。E-mail: 329866176@qq.com

* 通讯作者: 戴灵鹏 E-mail: lpdai@wzu.edu.cn

原、蛋白质含量、SOD 酶活性和微核率的影响,旨在评价夹竹桃皂甙对非靶标生物的毒害效应,阐明夹竹桃皂甙作为植物灭螺剂其推广应用是否对环境友好,同时也为生物农药的环境安全评价提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料和培养

鲫鱼(*C. auratus*)幼鱼购自温州市苍南县湊浦鱼苗繁殖场,大小一致,平均体长(7.02±0.41)cm,平均体重(10.08±1.73)g。试验前在室内用脱氯自来水驯养7 d。饲养条件:水温(19±2)℃,pH 6.5±0.2,光暗比为14 h:10 h。驯养期间没有出现自然死鱼现象。

1.2 夹竹桃皂甙的提取

夹竹桃(*N. indicum*)新鲜叶采自温州大学校园内。夹竹桃皂甙的提取按 Wang 等^[9]的方法。将夹竹桃新鲜叶洗净,加75%乙醇适量灭活,搅碎后,用10倍于鲜叶重量的70%~75%乙醇加热至70℃温浸12 h,提取3次后去除残渣,减压回收乙醇,沉淀过滤除杂;接着用乙醚处理浓缩滤液,弃醚层;再在水溶液中加入饱和碱式醋酸铅水溶液,过滤去沉淀;然后将滤液通入H₂S气体之后再次过滤去沉淀,浓缩滤液静置可析出结晶或快速风干成固态物质,便得到夹竹桃皂甙。从100 g新鲜叶中获得0.040 2 g夹竹桃皂甙。

1.3 染毒试验

采用半静态法,在容积为60 cm×30 cm×45 cm的长方体塑料水族箱中,按每10 L水体投放3条鱼的比例进行试验。夹竹桃皂甙的染毒浓度为5.89、20.12 mg·L⁻¹和80.76 mg·L⁻¹(分别为夹竹桃皂甙对福寿螺72、48 h和24 h的IC₅₀),另设不含皂甙的无氯自来水为对照。每个浓度设3个平行组,每个重复饲养15尾鲫鱼,连续染毒处理14 d,然后用不含皂甙的清水继续恢复饲养7 d。试验期间水温为(19±2)℃,pH值为6.5±0.2,溶解氧为(7.6±0.5)mg·L⁻¹,光暗比为14 h:10 h。每隔24 h更换1次染毒液,以保持皂甙浓度的稳定,更换溶液前2 h投饵,约50 g。试验开始后连续观察、记录实验鱼的中毒症状和死亡情况,并于7、14 d和21 d(即恢复饲养7 d)分别从各处理样中随机取鱼5尾测定鲫鱼特定生长率和取鱼1尾测定生理生化指标。

1.4 测定指标及方法

1.4.1 特定生长率

参考 Luz 等^[10]的方法,分别在7、14 d和21 d测

定各组鱼的体重(精确到0.1 g)并计算出特定生长率(SGR),计算公式如下:

$$SGR(\% \cdot d^{-1}) = (\ln W_t - \ln W_0) \times 100 / t \times 100\%$$

式中, W_0 为试验开始时鱼体重,g; W_t 为试验结束时鱼体重,g; t 为试验天数,d。

1.4.2 肝胰脏糖原含量测定

采用蒽酮法^[11]并稍加修改。按质量体积比1:10加入5%三氯乙酸溶液,在冰浴条件下将肝胰脏匀浆,过滤并定容至10 mL,吸取2 mL提取液于试管中,加2 mL、30% KOH,沸水浴中反应60 min。取2 mL糖原检测液再加入加4 mL蒽酮试剂,摇匀,于沸水浴中反应10 min后,测各管吸光度值。取10~50 μg葡萄糖同法测定其吸光度值,即可以此为标准计算样品中的糖原含量。

1.4.3 肝胰脏超氧化物歧化酶(SOD)活性和蛋白质含量的测定

将肝胰脏用冰生理盐水(0.86%)洗净血液,滤纸吸干,迅速称取适量置于冰浴中,加入冰生理盐水,体积质量比为10:1,用玻璃匀浆器匀浆,将匀浆液于4℃、10 000 g下离心10 min,取上清液置于-20℃冰箱内保存待用。SOD活性的测定采用邻苯三酚自氧化法^[12],反应溶液为9.0 mL、pH 8.2的Tris-HCl缓冲液、0.1 mL邻苯三酚和10.0 μL上清液,反应温度为25℃,测定波长为325 nm,邻苯三酚的自氧化速率控制在0.07 OD·min⁻¹左右。蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝G-250法^[13],以牛血清白蛋白(BSA)制作标准曲线。

1.4.4 微核率的测定

参考 Sanchez-Galan 等^[14]的方法。从各处理组随机取鱼,将鱼断尾取血制作血涂片,自然晾干,甲醇固定15 min,10%Gimesa染色20 min,蒸馏水冲洗,风干,在10×100倍显微镜(油镜)下检测微核的数量。每尾鱼至少统计5 000个外周血有核红细胞中出现的微核数,计算微核出现的千分率。

1.5 统计分析

结果以平均数±标准偏差(Mean±SD)来表示,用SPSS12.0统计软件对试验数据进行单因素方差分析和最小显著差法(LSD)进行显著性检验,用不同字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 毒性反应观察

对照组、5.89 mg·L⁻¹和20.12 mg·L⁻¹处理组的鱼

游动正常,处于正常状态,试验期间无死亡。在 $80.76 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 夹竹桃皂甙的处理下,鲫鱼出现中毒症状,中毒初期,出现浮头、呼吸频率加快和身体失去平衡(侧游和翻游);后期则为活动能力明显减缓,横卧于底部,呼吸频率缓慢,5 d 后全部死亡。

2.2 夹竹桃皂甙对鲫鱼幼鱼特定生长率的影响

由表 1 可知, $5.89 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 皂甙处理与对照组相比无显著差异。在 $20.12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 皂甙处理 7 d 后,鲫鱼幼苗特定生长率则显著下降;处理 14 d 后达到最低,仅为对照组的 66.4%;恢复饲养 7 d 后,虽与对照组仍存显著差异,但鲫鱼幼苗特定生长率上升,为对照组的 76.5%。

2.3 夹竹桃皂甙对鲫鱼幼鱼肝胰脏糖原含量的影响

由图 1 可知,在不同浓度的皂甙处理下,肝糖原含量表现出显著的不同。在整个试验期间, $5.89 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 皂甙处理与对照组相比无显著差异。 $20.12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 皂甙连续染毒 7 d 和 14 d 后,鲫鱼幼鱼肝胰脏糖原含量分别为对照组的 71.8% 和 46.7%;恢复饲养后,肝糖原含量逐渐上升,7 d 后其含量与对照组无显著差异。

2.4 夹竹桃皂甙对鲫鱼幼鱼肝胰脏蛋白质含量的影响

表 1 夹竹桃皂甙对鲫鱼幼鱼特定生长率的影响

Table 1 Effects of cardiac glycosides from *N. indicum* on specific growth rate of juvenile *C. auratus*

皂甙浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	不同染毒时间的特定生长率/ $\% \cdot \text{d}^{-1}$		
	7 d	14 d	21 d
0	$1.16 \pm 0.07\text{a}$	$1.22 \pm 0.17\text{a}$	$1.19 \pm 0.06\text{a}$
5.89	$1.15 \pm 0.10\text{a}$	$1.18 \pm 0.13\text{a}$	$1.23 \pm 0.07\text{a}$
20.12	$0.99 \pm 0.04\text{b}$	$0.81 \pm 0.09\text{b}$	$0.91 \pm 0.08\text{b}$

注:表中数值为 3 个重复的平均值 $\pm$ 标准差,同一列数据不同字母代表差异显著($P < 0.05$),下同。

Notes: Data represent mean $\pm$ SD ($n=3$), data in the same column with different letters shows significant difference ($P < 0.05$), the same below.

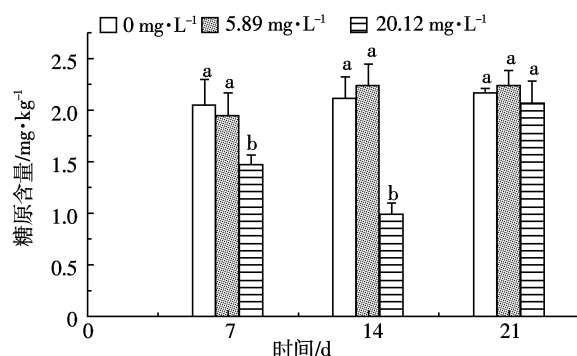


图 1 夹竹桃皂甙对鲫鱼幼鱼肝胰脏中糖原含量的影响
Figure 1 Effect of cardiac glycosides of *N. indicum* on glycogen content in hepatopancreas of juvenile *C. auratus*

如图 2 所示,在不同浓度的皂甙处理下,蛋白质含量与对照组无显著差异,仅 $20.12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 皂甙染毒 14 d 后,蛋白质含量显著下降,为对照组的 82.0%。

2.5 夹竹桃皂甙对鲫鱼幼鱼肝胰脏 SOD 酶活性的影响

从图 3 可以看出,夹竹桃皂甙对鲫鱼幼鱼肝胰脏 SOD 酶活性也产生显著的影响。与对照组相比, $5.89 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 皂甙处理的 SOD 酶活性在整个试验期间没有显著变化。在 $20.12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 皂甙处理 7 d 后, SOD 酶活性显著高于对照组;当染毒时间延长至 14 d 后, SOD 酶活性含量显著低于对照组,仅为对照组的 71.5%。恢复饲养 7 d 后, SOD 酶活性重新上升,恢复到对照组的 83.7%。

2.6 夹竹桃皂甙对鲫鱼幼鱼微核率的影响

如图 4 所示,鲫鱼幼鱼微核率在整个试验期间几乎保持稳定,各处理组与对照组相比,均无显著差异。

3 讨论

根据我国《化学农药环境安全评价试验准则》^[15] 的评价标准,化学物质对鱼类的 $96 \text{ h-IC}_{50} > 0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

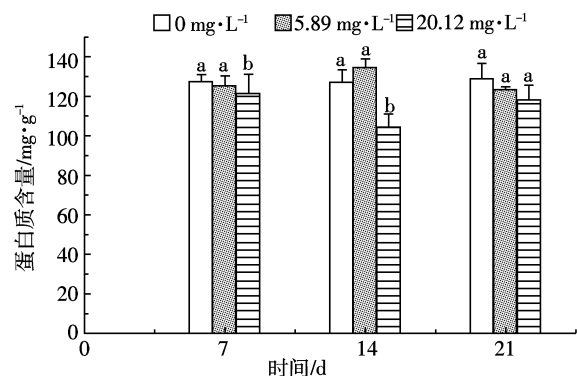


图 2 夹竹桃皂甙对鲫鱼幼鱼肝胰脏中蛋白质含量的影响
Figure 2 Effect of cardiac glycosides of *N. indicum* on protein content in hepatopancreas tissues of juvenile *C. auratus*

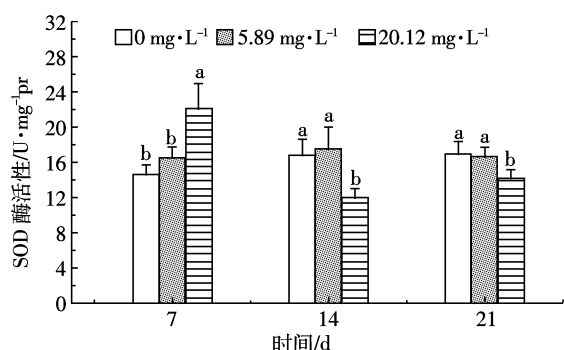


图 3 夹竹桃皂甙对鲫鱼幼鱼肝胰脏中 SOD 酶活性的影响
Figure 3 Effect of cardiac glycosides of *N. indicum* on SOD activity in hepatopancreas of juvenile *C. auratus*

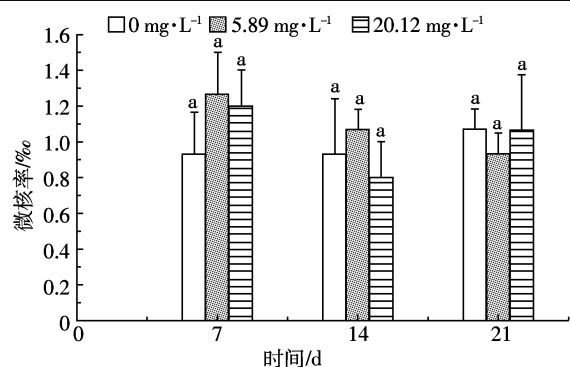


图4 夹竹桃皂甙对鲫鱼幼鱼微核率的影响

Figure 4 Effects of cardiac glycosides from *N. indicum* on micronucleus rate of juvenile *C. auratus*

为低毒农药。本试验结果表明,在 $80.76 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 皂甙的处理下,鲫鱼出现中毒症状,5 d 后全部死亡;当夹竹桃皂甙处理浓度 $\leq 20.12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,处理组的鱼在试验期间无死亡。因此,初步判断夹竹桃皂甙为低毒农药。但与对照相比, $20.12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 皂甙处理使鲫鱼幼鱼特定生长率显著下降(表1)。特定生长率是动物生长发育的各种生命活动受影响后的综合表现,是衡量生长状况的一个重要指标^[10]。本结果表明,一定浓度的皂甙胁迫能破坏鱼体正常的生理机能,从而抑制鲫鱼的正常生长和发育,最终导致其特定生长率下降。

肝胰脏是鲫鱼最重要的解毒器官,也是对农药及其他污染物较敏感和易受伤害的器官,因此肝胰脏常被用来监测各种有毒物质对生物体的影响^[16-17]。本文以肝胰脏为研究对象,进一步研究了皂甙对鲫鱼肝胰脏生理生化指标的影响,从而更好的阐明夹竹桃皂甙对鲫鱼的毒害效应。

糖原是动物体内糖的贮存形式之一,很易降解为葡萄糖从而提供 ATP,为各项生理活动提供能量。当动物受到外界因子的影响而发生生理或病理变化时,糖原含量通常会出现典型的胁迫反应,所以糖原含量的变化常被作为动物对胁迫应答的敏感指标之一^[18]。本研究结果表明, $20.12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 夹竹桃皂甙处理的鲫鱼肝内糖原含量在实验期间急剧下降(图1),这与夹竹桃皂甙对钉螺糖原含量影响^[9]所得到的结果一致。一般而言,糖原通过糖酵解或己糖磷酸途径被快速降解和利用,为各项生理活动提供能量,从而增强生物的抗逆性^[19-20]。因此,糖原含量的急剧下降可能是鲫鱼对皂甙胁迫的一种生理适应,以满足解毒及某些生理活动能量的需求。

蛋白质是生物的主要组成成分并且在物质代谢和生化反应中起着重要作用,是反映动物生命活动的

重要生理指标,因而蛋白质含量的变化常作为毒理学指标之一^[21]。由图2可知, $20.12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 皂甙对肝胰脏蛋白质含量的影响分为两个阶段:染毒7 d后,蛋白质含量与对照组无显著差异;染毒14 d后,蛋白质含量显著低于对照组。蛋白质的含量决定于蛋白质的合成或分解^[22]。在染毒初期,蛋白质含量没有出现显著变化的可能原因是鱼体通过应激机制,增加蛋白质的合成以补偿皂甙胁迫造成的损失。Gill 等^[23]认为,为了满足解毒的需求,生物体通常会增加解毒酶蛋白质的合成。这与本文中皂甙对 SOD 酶(图3)的研究结果一致。在染毒后期,皂甙导致蛋白质含量下降有两方面的原因:一是皂甙使鲫鱼肝胰脏组织受损程度严重,抑制了新蛋白质合成;二是在极端胁迫条件下,蛋白质可作为能量的替代来源^[19,21]。因此,在能量缺乏的条件下,加速了原有蛋白质的分解,以满足解毒时对能量的需求,从而进一步解释肝胰脏糖原含量在胁迫期间的急剧下降。是否如此,还需进一步研究。

SOD 能将 $\text{O}_2 \cdot$ 分解为 H_2O_2 和 O_2 ,是最重要的抗氧化酶之一^[24]。由于 SOD 对污染物胁迫相当敏感,其活性变化可用作指示环境污染的早期预警^[25]。Roberts 等^[26]认为,当鱼体受到轻度污染胁迫时,抗氧化酶活性被诱导,但当受到重度胁迫时,其酶活性则被抑制。本研究发现,在 $20.12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 皂甙处理下, SOD 活性表现出先升后降的趋势(图3),说明 SOD 酶作为可诱导酶,在一定浓度的皂甙胁迫下,由于酶蛋白合成增加,其活性出现诱导,以此清除体内多余的活性氧,可保护自身不受过氧化损伤;当活性氧的产生量超出抗氧化防御系统的清除能力,可能造成活性氧自由基的积累和对细胞膜的损伤,造成了鲫鱼肝胰脏细胞损伤, SOD 酶合成受阻,故活性随之下降。

微核检测技术是检测有毒物质对生物细胞遗传损伤的一个常用指标,可迅速可靠地反映机体染色体损伤、DNA 复制紊乱等异常状况^[14,27-28]。本试验结果表明,对照组相比,各剂量组间的微核率无统计学差异(图4),可初步判断夹竹桃皂甙对鲫鱼无遗传毒性。

各处理组在清水中恢复7 d后,鲫鱼幼苗特定生长率(表1)和 SOD 活性(图3)受到的抑制作用逐渐减弱,尤其是糖原含量(图1)、蛋白质含量(图2)与对照组相比均无显著差异,这与夹竹桃皂甙对水稻幼苗株高和生物量的影响所得到的结果相符^[29]。上述结果说明夹竹桃皂甙作为生物源类药物,不会产生蓄积毒性,可在动物体内迅速代谢失活,从而对鲫鱼幼鱼的毒害作用逐渐减弱。

4 结论

(1)夹竹桃皂甙对鲫鱼的毒性属低等毒性且未发现遗传毒性。

(2)当环境中的皂甙浓度达一定程度时,可导致鲫鱼幼鱼的正常生理代谢紊乱、失调,生长受到暂时性抑制,严重时可导致其死亡。因此,在稻田施用高浓度皂甙灭螺时,应尽量避免对附近水体的污染或在排入自然水体前进行适当的处理,以减少对非靶标生物的危害。

参考文献:

- [1] Singh A, Singh D K, Mishra T N, et al. Molluscicides of plant origin[J]. *Biological Agriculture and Horticulture*, 1996, 13: 205–252.
- [2] Ke W S, Yang J L, Meng Z, et al. Evaluation of molluscicidal activities of *Arisaema tubers* extracts on the snail *Oncomelania hupensis*[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2008, 92: 129–132.
- [3] Kumar P, Singh D K. Molluscicidal activity of *Ferula asafoetida*, *Syzygium aromaticum* and *Carum carvi* and their active components against the snail *Lymnaea acuminata*[J]. *Chemosphere*, 2006, 63: 1568–1574.
- [4] Sharma P, Choudhary A S, Parashar P, et al. Chemical constituents of plants from the genus *nerium*[J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2010, 7: 1198–1207.
- [5] Singh S, Singh D K. Molluscicidal activity of *Nerium indicum* leaf[J]. *Fitoterapia*, 1997, 68: 545–546.
- [6] Yang W, Xiang F H, Sun H G, et al. Changes in the selected hematological parameters and gill Na⁺/K⁺ATPase activity of juvenile crucian carp *Carassius auratus* during elevated ammonia exposure and the post-exposure recovery[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2010, 38: 557–562.
- [7] Zhang J F, Shen H, Wang X R, et al. Effects of chronic exposure of 2, 4 dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*[J]. *Chemosphere*, 2004, 55: 167–174.
- [8] Yi X H, Ding H, Lu Y T, et al. Effects of long-term alachlor exposure on hepatic antioxidant defense and detoxifying enzyme activities in crucian carp (*Carassius auratus*) [J]. *Chemosphere*, 2007, 68: 1576–1581.
- [9] Wang W X, Yang Y, Wang H, et al. Allelopathic potential of *Nerium indicum* on *Oncomelania hupensis*[J]. *Allelopathy Journal*, 2008, 21(2): 405–410.
- [10] Luz R K, Martínez-Álvarez R M, De Pedro N, et al. Growth, food intake regulation and metabolic adaptations in goldfish (*Carassius auratus*) exposed to different salinities[J]. *Aquaculture*, 2008, 276: 171–178.
- [11] Van Der Vies J. Two methods of determination of glycogen in liver[J]. *Biochemical Journal*, 1954, 57: 410–416.
- [12] 邹国林, 桂兴芬, 钟晓凌, 等. 一种 SOD 的测活方法邻苯三酚自氧化法的改进[J]. 生物化学与生物物理进展, 1986, 4: 71–73.
- [13] ZOU Guo-lin, GUI Xing-fen, ZHONG Xiao-lin, et al. SOD detection method: The modified method in pyrogallol autooxidation[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 1986, 4: 71–73.
- [13] Bradford M. A rapid and sensitive assay of protein utilizing the principle of dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248–254.
- [14] Sanchez-Galan S, Linde A R, Izquierdo J I, et al. Micronuclei and fluctuating asymmetry in brown trout (*Salmo trutta*): Complementary methods biomonitor freshwaters ecosystems[J]. *Mutation Research*, 1998, 412: 218–225.
- [15] 蔡道基, 杨佩芝, 龚瑞忠, 等. 化学农药环境安全评价试验准则[M]. 北京: 国家环保局, 1989.
- CAI Dao-Ji, YANG Pei-zhi, GONG Rui-zhong, et al. Testing guideline for a safety evaluation of pesticide to environment[M]. Beijing: State Environment Protection Administration of China, 1989.
- [16] Bautista M N, Lavilla-Pitogo C R, Subosa P F. Aflatoxin B1 contamination of shrimp feeds and its effect on growth and hepatopancreas of pre-adult *Penaeus monodon*[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1994, 65: 5–11.
- [17] Wu J P, Chen H C, Huang D J. Histopathological and biochemical evidence of hepatopancreatic toxicity caused by cadmium and zinc in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. *Chemosphere*, 2008, 73: 1019–1026.
- [18] Saravanan M, Kumar D V, Malarvizhi A, et al. Biosafety of *Azadirachta indica* (A. Juss.) leaves extracts on certain biochemical parameters of *La-beo rohita*[J]. *Journal of Biopesticides*, 2010, 3: 227–231.
- [19] Scott G R, Sloman K A. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: Integrating behavioural and physiological indicators of toxicity[J]. *Aquatic Toxicology*, 2004, 68: 369–392.
- [20] Sobha K, Poornima A, Harini P, et al. A study on biochemical changes in the freshwater fish, *Catla catla* (Hamilton) exposed to the heavy metal toxicant cadmium chloride[J]. *Kahmandu University Journal of Science, Engineering and Technology*, 2007, 3(2): 1–11.
- [21] Suryavanshi U, Sreepada R A, Ansari Z A, et al. A study on biochemical changes in the penaeid shrimp, *Metapenaeus monodactylus* (Fabricius) following exposure to sublethal doses of organochlorine pesticide (endosulfan)[J]. *Chemosphere*, 2009, 77: 1540–1550.
- [22] Ogueji Okechukwu E, Auta J. The effects of sub-lethal doses of lambda-dacyhalothrin on some biochemical characteristics of the African catfish *Clarias gariepinus*[J]. *Journal of Biological Sciences*, 2007, 7(8): 1473–1477.
- [23] Gill T S, Pande J, Tewari H. Sublethal effects of an organophosphorus insecticide on certain metabolite levels in a freshwater fish, *Puntius conchoni* Hamilton[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1990, 36: 290–299.
- [24] Zhang J F, Liu H, Sun Y Y, et al. Responses of the antioxidant defenses of the Goldfish *Carassius auratus*, exposed to 2, 4-dichlorophenol[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2005, 19: 185–190.
- [25] 朱小山, 朱琳, 郎宇鹏, 等. 人工纳米材料富勒烯(C₆₀)低剂量长期暴露对鲫鱼的氧化伤害[J]. 环境科学, 2008, 29(4): 855–861.
- ZHU Xiao-shan, ZHU Lin, LANG Yu-peng, et al. Oxidative damages of long-term exposure to low level fullerenes (C₆₀) in *Carassius auratus*[J]. *Environmental Science*, 2008, 29(4): 855–861.
- [26] Roberts M H, Sved D W, Felton S P. Temporal changes in AHH and SOD activities in feral spot from the Elizabeth river, a polluted sub-estuary[J]. *Marine Environmental Research*, 1987, 23(2): 89–101.
- [27] Rodriguez-Cea A, Ayllon F, Garcia-Vazquez E. Micronucleus test in freshwater fish species: An evaluation of its sensitivity for application in field surveys [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2003, 56: 442–448.
- [28] Udroui I. The micronucleus test in piscine erythrocytes[J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, 79(2): 201–204.
- [29] 戴灵鹏, 罗蔚华, 王万贤. 夹竹桃皂甙对福寿螺的毒杀效果及其对水稻幼苗的影响[J]. 生态学报, 2011, 31(7): 1918–1924.
- DAI Ling-peng, LUO Wei-hua, WANG Wan-xian. Molluscicidal efficacy of *Nerium indicum* cardiac glycosides on *Pomacea canaliculata* and its effects on rice seedling[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(7): 1918–1924.