

藻华暴发期太湖不同湖区水样对 斑马鱼胚胎发育及仔鱼生长毒性研究

许晨红^{1,2}, 赵庆顺², 王晓琳¹, 武俊¹, 曾巾¹, 杨柳燕¹

(1.污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京大学环境学院, 南京 210093; 2.南京大学模式动物研究所, 南京 210061)

摘要:为了评价太湖蓝藻暴发对生态系统的危害程度,于蓝藻水华暴发的2009年7月在太湖梅梁湾(M1和M2)、湖心区(H)和胥口湾(X)4个点采集水样,将斑马鱼(*Danio rerio*)胚胎直接暴露于水样中,研究太湖不同湖区水质对斑马鱼胚胎发育和仔鱼生长的影响。结果表明,暴露于梅梁湾M2点的斑马鱼胚胎畸形率为7%,显著高于空白组(K)($P<0.01$),湖心H和梅梁湾M1点为5%左右,也高于空白组($P<0.01$),而胥口湾X点和空白组无显著性差别($P>0.05$)。蓝藻暴发水体对斑马鱼胚胎产生致畸作用,表现为脊椎弯曲、尾部弯曲和心包水肿等。同时,不同湖区水样对仔鱼生存活力指数(SAI)的影响表明,梅梁湾M2点仔鱼活力最弱,胥口湾X点仔鱼活力最强。试验期间梅梁湾M2点蓝藻密度最高,胥口湾最低,太湖蓝藻密度的分布与斑马鱼胚胎发育的畸形频率具高度的一致性。因此,藻华暴发水体会对脊椎动物胚胎发育和仔鱼生长产生不利影响,危害水生态系统的安全。

关键词:蓝藻水华;太湖;斑马鱼;毒性

中图分类号:X503.225 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2010)08-1443-05

Toxic Effect of Water Contained with Cyanobacterial Bloom on Embryo Development and Surviving Activity of Zebrafish in Lake Taihu, China

XU Chen-hong^{1,2}, ZHAO Qing-shun², WANG Xiao-lin¹, WU Jun¹, ZENG Jin¹, YANG Liu-yan¹

(1.State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 2.Model Animal Research Center of Nanjing University, Nanjing 210061, China)

Abstract: The cyanobacterial blooms in Lake Taihu has been recognized to be dangerous to aquatic ecosystems and human beings. To evaluate the healthy risk of the cyanobacterial bloom in Lake Taihu, the water samples were collected respectively from Meiliang Bay (M1 and M2), center of Lake Taihu (H) and Xukou Bay of Lake Taihu to study the effects of the lake water on zebrafish early development in July 2009 when cyanobacterial bloom occurred seriously in Lake Taihu. In the study, zebrafish embryos were directly exposed to the water that was collected from the lake and the test water was updated daily. The results showed that the water samples contained with cyanobacterial bloom from Lake Taihu had teratogenic effects on zebrafish embryos. The teratogenic defects included curved trunk, bended tails, and edema in pericardial sac. The teratogenicity rate of M2 (up to 7%) was obviously higher than that of control (K) ($P<0.01$), H and M1 (about 5%) was higher than K ($P<0.01$) while there was no significant difference between X and K ($P>0.05$). Moreover, the SAI (Surviving Activity Index) of M2 was significantly lower than that of H, M1 and X. The results were consistent with the distribution of cyanobacteria's density during the experimental period in Lake Taihu. Thus, The results suggested that the water samples contained cyanobacterial bloom from Lake Taihu were toxic to vertebrate early development.

Keywords: cyanobacterial bloom; Lake Taihu; zebrafish; toxicity

收稿日期:2010-02-05

基金项目:国家重点基础研究发展计划(2008CB 418102);国家水专项(2009ZX07106-001-002)

作者简介:许晨红(1986—),女,安徽桐城人,在读硕士,主要研究方向为生态毒理学。E-mail:redsun.xuchenghong@gmail.com

通讯作者:杨柳燕 E-mail:yangly@nju.edu.cn

最近十年太湖藻华暴发时间不断提前,持续时间越来越长,暴发频率越来越高。藻华的范围不断扩大,以北部湖区为主不断向湖中心和南部发展^[1-2]。以蓝藻为优势种的藻华产生多种次生代谢产物给公众健康带来了极大的隐患^[3-4]。研究表明,蓝藻的粗提物明显抑制小鼠肝脏氧化酶活性^[5],降低青鳉鱼胚胎存活率,导致幼鱼肝脏异常^[6]。流行病学研究也证明长期饮用含藻毒素水导致癌症发病率上升^[7]。在水华暴发过程中除藻毒素外还会产生其他次生代谢产物,而且水体中原本就存在金属离子和持久性有机物等等,对于它们的联合毒性作用的研究还尚未明确。2007 年太湖蓝藻大暴发期间,梅梁湾的蓝藻滤液会显著提高蚕豆根尖细胞微核率^[8]。鱼作为直接暴露于水体的生物,研究藻华水样对其影响对评价水体的健康效应更有指导意义。

斑马鱼(*Danio rerio*)是一种小型热带鱼。具有产卵量大、易收集和饲养简单等优点,现已成为一些生态毒理测试标准方法(如 OECD 和 ISO 标准)中推荐的模式物种之一。斑马鱼胚胎畸形率和幼鱼成活率能敏感地反映水体中污染物的毒性。斑马鱼胚胎毒性测试技术是各国标准组织认可的测定单一化学品毒性标准测定方法之一,属于致畸效应检验。该项技术成本低、影响因素少、可重复性好、易操作和灵敏度高,具有可记录多项毒性指标的特点。因此,为了检测蓝藻水华暴发过程中湖水的毒性,于蓝藻水华暴发时,在太湖选取藻华密度不同的湖区采集水样,直接暴露斑马鱼胚胎,然后观察胚胎发育和仔鱼生长状况。

1 材料与方法

1.1 采样点布置和水样采集分析

太湖藻华空间分布呈现西北部湖区最严重,向湖心和东南部湖区逐渐减少的趋势。为了解蓝藻暴发期间水质安全状况,由北向东南在太湖选取 4 个采样点(如图 1 所示),分别标为 M1(梅梁湾岸边 E 120°12′44″N,31°29′42″)、M2(梅梁湾中心 E 120°11′31.2″N,31°28′6.4″)、H(湖心 E 120°12′12.6″N,31°21′58.8″)和

X(胥口湾 E 120. 24′23″N,31°10′31″)。每 2 d 采集 1 次水样,共采集 4 次,每次采集在 4 h 内完成。测定的水质指标包括水温、pH、电导率、总氮(TN)、氨氮、总磷(TP)和藻毒素(MC-LR 及 MC-RR),其平均值见表 1。水样的采集、分析等按照湖泊生态系统观测方法进行^[9],其中 MC-LR 和 MC-RR 用 HPLC 检测^[10]。

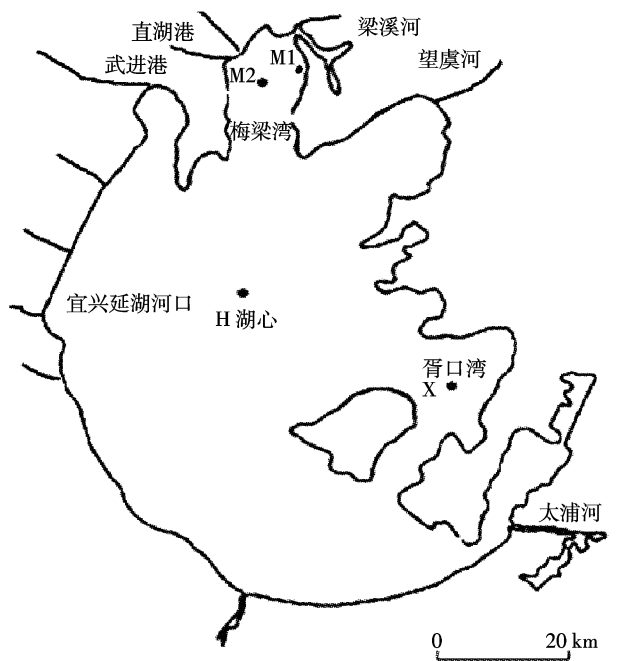


图 1 太湖水样采集的位点图
Figure 1 Map of sampling sites in Lake Taihu

1.2 斑马鱼早期胚胎发育试验

斑马鱼受精卵取自南京大学模式动物研究所。试验时,将当日产的健康斑马鱼受精卵 50 枚·培养皿⁻¹于 25℃±1℃条件下(12 h 光照/12 h 黑暗)培养。设立空白组(K)为充分曝气的孵化水(60 mg 海盐·L⁻¹)^[11],暴露组为梅梁湾(M1 和 M2)、湖心区(H)和胥口湾(X)4 个点采取的水样。每组 3 个平行共 150 枚胚胎。每隔 24 h 更换一次新采集的水样,并在体视镜下观察胚胎的发育情况,统计畸形率,记录畸形表型和拍照。

1.3 斑马鱼仔鱼生存活力试验

4 个处理组及空白组中斑马鱼胚胎孵化 2 d 后的

表 1 太湖不同位点水样的理化指标
Table 1 Physical and chemical indexes of water samples from different sites in Lake Taihu

指标	水温/℃	pH	电导率/mS·cm ⁻¹	TN/mg·L ⁻¹	氨氮/mg·L ⁻¹	TP/μg·L ⁻¹	MC-LR/μg·L ⁻¹	MC-RR/μg·L ⁻¹
梅梁湾(M1)	33.2	9.47	0.508	1.92	0.457	190.0	0.402	0.307
梅梁湾(M2)	33.1	9.58	0.504	1.37	0.483	319.5	0.534	0.490
湖心(H)	32.7	8.93	0.509	1.51	0.250	139.5	0.334	0.184
胥口湾(X)	31.1	8.70	0.579	1.72	0.134	74.5	0.016	0

正常仔鱼,每组随机取10条,在不投饵不曝气不换水条件下,在孵化水中培养,每隔24 h观察记录每个培养皿中仔鱼死亡数量,直至仔鱼全部死亡,计算仔鱼生存活力指数(Survival Activity Index,SAI)^[11]。

仔鱼生存活力指数计算公式为:

$$SAI = \sum_{i=1}^k (N - h_i) \times i / N$$

式中:SAI为生存活力指数;N为试验开始时的仔鱼数; h_i 为第*i*天仔鱼死亡累计数;*k*为生存尾数为0时的天数。

1.4 统计学检验

试验数据值为平均值±标准误差,畸形率采用统计软件Excel 2007卡方分析检验显著性,生存活力指数采用SPSS10.0做SPEARSON相关性分析。

2 结果与分析

2.1 不同位点的水样水质

有研究发现梅梁湾的藻型生态系统已进入相对稳定期,湖心区的蓝藻水华规模在不断发展中,胥口湾湖区沉水植物群落结构相对稳定,无水华发生^[2]。因此,设计M1、M2、H、X 4个点采集太湖水样,比较藻华不同暴发强度湖区水样对斑马鱼胚胎发育毒性的大小。现场采集水样观察发现:在梅梁湾中心的M2点水体中蓝藻浓度高、透明度低、有明显异味;靠东岸的M1点水体蓝藻浓度低,透明度高;湖心区H点水体蓝藻浓度较高,透明度低,有异味;胥口湾X点湖底长满水草,水体清澈,透明度高。测得的MC-LR浓度也说明了4个点蓝藻暴发的程度(表1)。

2.2 不同位点水样对斑马鱼胚胎畸形率的影响

第7 d时累计受试斑马鱼胚胎及仔鱼的畸形率的结果如图2。水样暴露组斑马鱼产生的畸形表型包括心包水肿、脊椎弯曲和尾部弯曲等,而空白组无畸

形(图3所示)。M2点水样受试斑马鱼的畸形率达到(7.03±1.13)%,显著高于空白组($P<0.01$),暴露于H、M1和X点水样的畸形率分别为(5.46±1.26)%、(4.12±0.06)%和(2.06±0.06)%,畸形率呈现出M2最高、H和M1接近、X最低的空间变化趋势。这一结果表明,蓝藻水华暴发的湖区水体会对斑马鱼胚胎产生致畸作用,并且藻华暴发强度越大的区域水样对斑马鱼胚胎的致畸作用越强。

2.3 不同位点水样对仔鱼生存活力指数的影响

取暴露于太湖水样的2 d龄仔鱼进行生存活力试验,即在不投饵(饥饿)、无换水、无充气情况下,观察仔鱼的耐受能力和存活天数,得到仔鱼SAI,生存指数越高,表明仔鱼成活率就越高,反映水体水质越好。太湖不同湖区位点水样对仔鱼生存活力指数影响的试验结果如图4所示,暴露于M2点水样仔鱼的SAI为7.80±1.73,显著低于空白组的14.37±2.83($P<0.01$),M1、H和X位点的SAI分别为10.37±2.23、10.40±0.10和12.43±1.22,均与空白组无显著差别($P>0.05$)。蓝藻浓度最高的M2点斑马鱼SAI值最

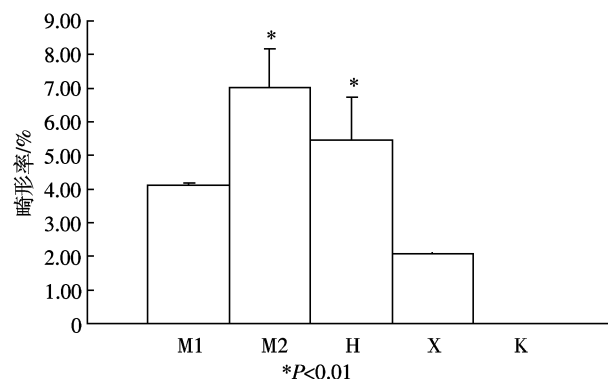
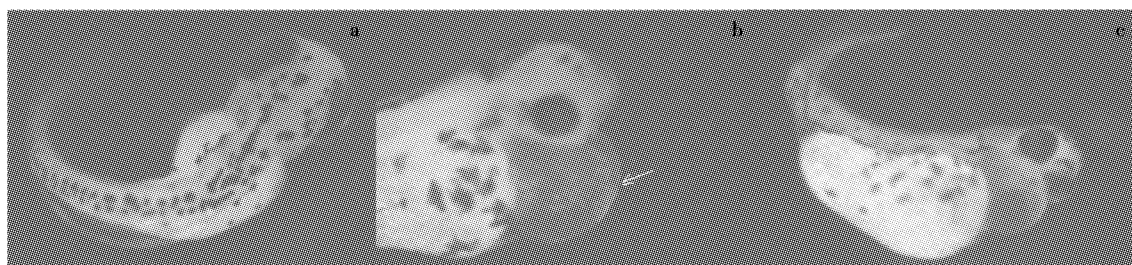


图2 太湖不同位点水样对斑马鱼胚胎的致畸率

Figure 2 The teratogenicity rate of zebrafish embryo exposed different lake water of Lake Taihu



尾部弯曲(a)、心包水肿(b)、脊椎弯曲和心包水肿(c)

Trunk and tail curing(a), edema in pericardial sac(b), cyrtosis and edema in pericardial sac(c)

图3 暴露藻华水样后斑马鱼胚胎畸形的表型

Figure 3 Malformations of zebrafish embryos exposed water samples of cyanobacterial bloom

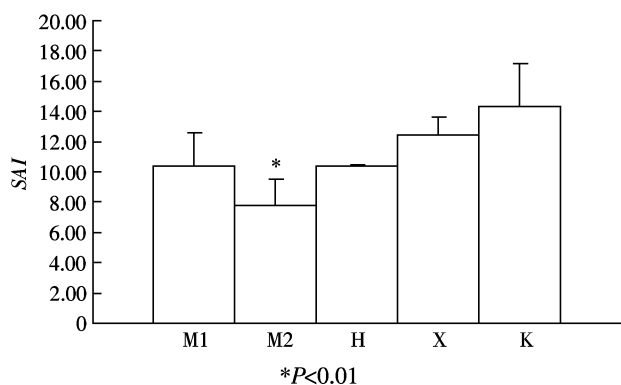


图 4 太湖不同位点水样斑马鱼幼鱼的生存活力系数

Figure 4 SAI of zebrafish larvae exposed different lake water of Lake Taihu

低,蓝藻浓度最低的 X 点 SAI 值最高,蓝藻暴发在一定程度上影响仔鱼的生存活力。

3 讨论

太湖是我国蓝藻水华严重暴发的湖泊之一,自 20 世纪 80 年代后期,太湖北部的梅梁湾开始频繁暴发蓝藻水华。近年来,太湖蓝藻水华暴发逐年加剧,太湖北部湖区以浮游藻类为主的生态系统变得越来越稳定,并不断向湖心区发展,只有太湖东南部沉水植物群落相对稳定^[2]。采样期间,位于梅梁湾中心的 M2 点蓝藻浓度高,有明显异味。由于风向、波浪等原因位于梅梁湾东岸 M1 点蓝藻较少。位于湖心区 H 点蓝藻密度较高,有异味。胥口湾 X 点水草茂盛,未见蓝藻水华。藻华成灾过程中能产生多种次级代谢产物如藻毒素和分解产物等,对其中微囊藻毒素(Microcystin MC)的毒性研究最为深入,它广泛存在于水体中并且影响人体健康。对太湖水体微囊藻毒素浓度的检测表明,在季节上太湖夏季 MC 浓度最高,在空间上梅梁湾湖区内 MC 浓度最高,最大 MC 浓度可达 $54.9 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,远大于 WHO 的饮用水水源地水质指导值 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[13]。相关研究中,斑马鱼胚胎暴露于 MC 浓度不超过 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的纯 MC-LR 水体中,胚胎早期发育不受影响,只是延迟幼仔的生长;只有暴露于 MC-LR 浓度为 $30 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $40 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水华提取物时,胚胎发育会产生畸形且死亡率显著提高^[3]。本试验中采用未经处理的太湖自然水样,其中 MC-LR 浓度都小于 $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,但仍会对斑马鱼胚胎有致畸效应,并且蓝藻水华最严重的 M2 点,其水样对斑马鱼胚胎畸形率达到 $(7.03 \pm 1.13)\%$,M1 和 H 点水样的胚胎畸形率也都大于 4%,而胥口湾水样的畸形率为 2.06%(图 5)。因此,藻毒素

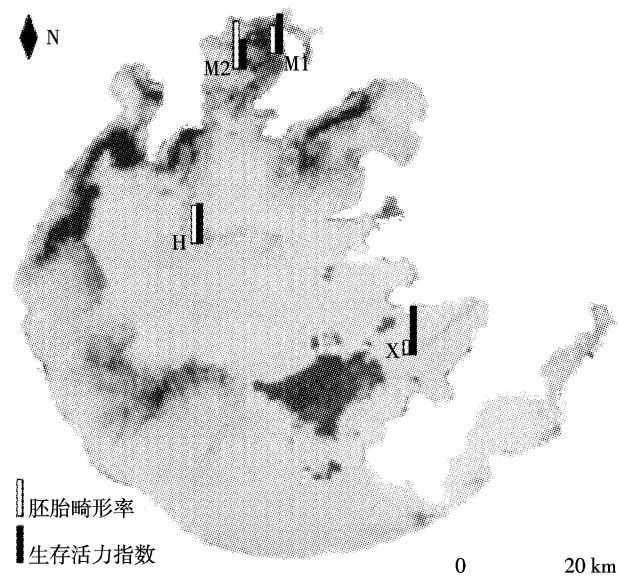


图 5 太湖不同湖区斑马鱼胚胎发育和幼鱼生存活力变化

Figure 5 The embryo development and SAI of zebrafish larvae exposed different lake water of Lake Taihu

可能不是引起斑马鱼胚胎发育毒性的主要毒物。

对太湖不同湖区水样理化分析过程中发现,梅梁湾水样的 pH 为 9.5 左右,湖心和胥口湾水样的 pH 小于 9.0,均大于国家渔业水质标准中规定的 pH 6.5~8.5。pH 升高会增加其他有毒物质的毒性,譬如促进 NH_4^+ 转变为非离子态氨。按照渔业水质标准中标明的氨水溶液中非离子氨的百分比,换算得到 M1、M2、H、X 水样中非离子氨浓度分别为 0.329 、 0.348 、 $0.113 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.040 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,均超过渔业水质标准中规定的 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[15]。非离子态氨浓度大于标准浓度时会对鱼类产生毒害作用,相关研究表明,非离子氨对虹鳟鱼幼仔 24 h 半致死浓度为 $0.07 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[16],对 26 d 龄草鱼 96 h 半致死浓度为 $0.570 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[17]。对于斑马鱼成鱼,非离子氨 96 h 半致死浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,非离子氨为 $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时即可抑制 30% 的 ATP 酶活^[18],胚胎发育阶段斑马鱼对非离子氨的敏感性明显高于成鱼^[18],所以水样中非离子氨浓度已达到造成斑马鱼胚胎损害的程度。因此,藻华水体对斑马鱼胚胎发育的毒性作用可能是其他污染物如氨氮或者其他污染物与藻毒素协同作用的结果。总体而言,本试验中斑马鱼胚胎畸形率与所采水样湖区蓝藻暴发程度相关,胚胎畸形率可以作为检测蓝藻水华水样毒性大小的指标之一;畸形率和生存活力试验结果一致,表明蓝藻暴发最为严重的梅梁湾,水质状况最差;湖心区蓝藻水华暴发程度中等,水质较差;而胥口湾为草型生态

系统,水质最优。因此,斑马鱼胚胎发育致畸性指标表明太湖不同湖区水质对斑马鱼胚胎发育的影响具有空间差异性,藻华暴发水体的水质是不安全的,会对水生生态系统产生不利的影响(图5)。

4 结论

现场观察以及测得的MCs数据表明,2009年7月太湖蓝藻分布状况是北部湖区最严重,湖心区次之,而东南部湖区胥口湾以沉水植物为主,未见蓝藻水华。太湖藻华暴发水体对斑马鱼胚胎产生致畸作用,藻华最严重的梅梁湾中心处M2水样对斑马鱼胚胎的畸形率高达7%。不同湖区水样对斑马鱼畸形率呈现M2最高,H和M1次之,X最低的趋势。畸形表型包括脊椎弯曲、尾巴弯曲和心包水肿等,表明蓝藻水华密度高的水体不利于斑马鱼胚胎发育。不同湖区水样对仔鱼生存活力也存在一定程度的影响,暴露于梅梁湾M2点水样的仔鱼活力指数最低,湖心区X点仔鱼活力指数最高,表明蓝藻水华密度高的水体不利于斑马鱼仔鱼的生长。

藻华暴发水体对斑马鱼胚胎发育的毒性效应可能是由藻毒素以外的其他污染物如氨氮或者其他污染物与藻毒素协同作用造成的。总之,藻华暴发水体会对鱼类胚胎发育和仔鱼生长产生不利影响,危害水生生态系统的安全。关于太湖藻华暴发水体对斑马鱼胚胎致毒的污染物种类鉴别和致毒机理有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Duan H, Ma R, Xu X F, et al. Two-decade reconstruction of algal blooms in china's Lake Taihu[J]. *Environmental Science and Technology*, 2009, 43:3522-3528.
- [2] 朱广伟. 太湖富营养现状 & 原因分析[J]. 湖泊科学, 2008, 20(1):21-26. ZHU Guang-wei. Eutrophic status and causing factors for a large, shallow and subtropical Lake Taihu, China[J]. *Lake Science*, 2008, 20(1):21-26.
- [3] 穆丽娜, 俞顺章. 微囊藻毒素的毒理学研究[J]. 卫生毒理学杂志, 2001, 15(2):59-60. MU Li-na, YU Shun-zhang. Toxicological study of microcystins[J]. *Journal of Health Toxicology*, 2001, 15(2):59-60.
- [4] Zhang X Z, Xie P, Wang W M, et al. Dose-dependent effects of extracted microcystins on embryonic development, larval growth and histopathological changes of southern catfish (*Silurus meridionalis*)[J]. *Toxicon*, 2008, 51:449-456.
- [5] Bao X F, Lu Y, Zhu T Y, et al. Toxic effects of cyanobacteria bloom extract containing microcystins on antioxidant enzymes in mice[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, 31(6):874-880.
- [6] Lecoz N, Malecot M, Quibier C, et al. Effects of cyanobacterial crude extracts from *Planktothrix agardhii* on embryo-larval development of medaka fish, *Oryzias latipes*[J]. *Toxicon*, 2008, 51:262-269.
- [7] 陈艳, 俞顺章, 杨坚波, 等. 太湖地区城市饮用水微囊藻毒素与恶性肿瘤死亡率的关系[J]. 中国癌症杂志, 2002, 12(6):485-489. CHEN Yan, YU Shun-zhang, YANG Jian-bo, et al. Microcystins in drinking water and cancer mortality in a city along Taihu Lake[J]. *China Oncology*, 2002, 12(6):485-489.
- [8] 谢晓玲, 徐德琳, 邓自发. 太湖蓝藻滤液的遗传毒性研究[J]. 生态科学, 2008, 27(4):208-211. XIE Xiao-ling, XU De-lin, DENG Zi-fa. The study on genotoxicity of blue-green algae filtrate during blue-green algae fast growth in Lake Tai[J]. *Ecological Science*, 2008, 27(4):208-211.
- [9] 陈伟民. 湖泊生态系统观测方法[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2004. CHEN Wei-min. Observation method of Lake ecosystem[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 2004.
- [10] 卫涛, 冯小刚, 袁春伟, 等. 水中痕量微囊藻毒素的检测[J]. 环境科学研究, 2005, 18(5):15-19. WEI Tao, FENG Xiao-gang, YUAN Chun-wei, et al. Determination of trace level microcystins in water[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2005, 18(5):15-19.
- [11] Monte W. The zebrafish book[M]. The University of Oregon Press, 1995.
- [12] Xu Y J, Liu X Z, Ma A J, et al. Effects of salinity on embryonic development and growth of early life stages of *Cynoglossus semilaevis* Günther[J]. *Marine Sciences*, 2005, 29(11):39-43.
- [13] 穆丽娜, 陈传伟, 俞顺章, 等. 太湖水体微囊藻毒素含量调查及其处理方法[J]. 中国公共卫生, 2000, 16(9):308-310. MU Li-na, CHEN Chuan-wei, YU Shun-zhang, et al. Investigation study on the content of microcystin in Lake Taihu and methods for microcystin treatment[J]. *China Public Health*, 2000, 16(9):308-310.
- [14] Axel O, Jutta F, Christian E W. Effects of microcystin-LR and cyanobacterial crude extracts on embryo-larval development of zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Water Research*, 1997, 31(11):2918-2921.
- [15] GB11607—1989, 中华人民共和国国家标准 渔业水质标准[S]. GB11607—1989, The People's Republic of China National Standard Fishery Water Quality Standards[S].
- [16] Stanley D R, Robert M S. Acute toxicity of ammonia to several developmental stages of rainbow trout (*Salmo gairdneri*)[J]. *Fishery Bulletin*, 1975, 73(1):207-211.
- [17] 周永欣, 张甫英, 周仁珍. 氨对草鱼的急性和亚急性毒性[J]. 水生生物学报, 1986, 10(1):32-40. ZHOU Yong-xin, ZHANG Fu-ying, ZHOU Ren-zheng. Acute and subacute toxicity of Ammonia to Grass[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1986, 10(1):32-40.
- [18] 韩力强, 康现江, 李双石, 等. 氨氮对斑马鱼2种代谢酶类的影响[J]. 河北大学学报, 2005, 25(2):180-186. HAN Li-qiang, KANG Xian-jiang, LI Shuang-shi, et al. Effect of Ammonia-N, two kinds of metabolic enzymes of zebra fish[J]. *Journal of Hebei University(Natural Science Edition)*, 2005, 25(2):180-186.
- [19] Pascoa A, Fontainhas F, Wilson J. Ammonia tolerance in the zebrafish (*Danio rerio*): Effects of ionic strength and ontogeny[C]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2008:s106-s107.