

铜绿微囊藻对克氏原螯虾幼虾存活及成虾几种酶类的影响

乐亚玲¹, 刘利平^{1*}, 李慷¹, 晏军¹, DIANA J S²

(1. 上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

2. School of Natural Resources and Environment, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA)

摘要: 为研究铜绿微囊藻对克氏原螯虾的影响, 将克氏原螯虾幼虾及成虾暴露在不同浓度的铜绿微囊藻溶液中, 研究了铜绿微囊藻对幼虾存活率、外部形态及肝胰腺超微结构的变化和成虾总血细胞密度(THCs)、血清中血蓝蛋白含量、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、过氧化物酶(POD)、酚氧化物酶(PO)以及鳃丝 Na^+/K^+ -ATP酶活性的影响。结果表明, (1) 高浓度的铜绿微囊藻能显著降低幼虾的存活率。(2) 显微观察表明, $1.0 \times 10^7/\text{mL}$ 及以上浓度的铜绿微囊藻液中培养7 d后, 幼虾肝胰腺呈现暗红色, 并伴有一定的肿大现象, 透射电镜显示其肝胰腺细胞受到损伤。(3) 高浓度的铜绿微囊藻能造成应激反应, THCs在暴露1 d后显著升高并稳定在较高水平; 血蓝蛋白含量变化不明显, 只在5 d时显著低于对照组($P < 0.05$), PO活性都表现出先显著性增强($P < 0.01$), 回落后又有所增加的波动趋势; 血清中的T-SOD活力在1 d后受到抑制, 5 d时被激活至较高水平; POD活性都表现出先显著性增强($P < 0.01$), 回落后又有所增加的波动趋势; 鳃丝中 Na^+/K^+ -ATP酶活性在暴露1 d后显著降低($P < 0.01$)后回升, 并最终维持在较高水平。研究结果表明, 高浓度的铜绿微囊藻能造成克氏原螯虾幼虾存活率显著降低并影响其肝胰腺超微结构; 而克氏原螯虾成虾对铜绿微囊藻有相对较强的耐受力, 血淋巴的酶学变化表明, 暴露在铜绿微囊藻水体的成虾经历过应激反应并有逐步适应的过程。

关键词: 铜绿微囊藻; 克氏原螯虾; 存活率; 超微结构; 酶

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)生活在沟渠、池塘等淡水水域中, 肉味鲜美, 环境耐受性强, 近年来在湖北、江苏等地得到广泛养殖。然而, 养殖水体的富营养化, 导致很多虾池蓝藻水华频繁爆发^[1-3], 引起学者们对蓝藻水华及其代谢产物的广泛关注。过去10年的大量研究证实, 自然水体中的铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)及微囊藻毒素对生物造成毒理学影响^[4-9], 蓝藻水华引起水质变化, 其毒素可在水生生物中积累并在食物链中传递, 给水产养殖和人类健康带来了严重的危害。目前, 有关铜绿微囊藻对克氏原螯虾影响的报道还较少。

本研究将克氏原螯虾幼虾及成虾暴露在不同

浓度的铜绿微囊藻溶液中, 研究其对幼虾的存活影响和对成虾血清中总血细胞密度(THCs), 血清中血蓝蛋白含量以及组织中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、酚氧化物酶(PO)和鳃丝中的 Na^+/K^+ -ATP酶活性的影响, 并通过显微观察和透射电镜观察了铜绿微囊藻对幼虾体色以及肝胰腺细胞结构的影响, 以期从细胞结构和功能两方面探讨铜绿微囊藻对克氏原螯虾的慢性毒理作用, 为虾类健康养殖提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

克氏原螯虾幼虾[体长:(12.09 ± 0.98) mm,

收稿日期:2011-02-17 修回日期:2011-05-16

资助项目:上海市教育委员会科研创新项目(09YZ277);上海市青年科技启明星计划项目(08QA1405900);美国国际发展署AquaFish CRSP项目;上海市重点学科资助(Y1101)

通讯作者:刘利平, E-mail:lp-liu@shou.edu.cn

体质量:(99.20 ± 13.80) mg]由上海海洋大学水产动物营养繁殖实验室赠送,成虾[体长(57.52 ± 3.84) mm,体质量(16.90 ± 2.10) g]来源于上海滩涂资源开发研究所。实验动物经 5% 食盐水消毒,并充分曝气后的淡水中于一周。随机挑选规格相似、四肢健全的个体用于实验。

铜绿微囊藻系中国科学院水生生物研究所赠送,用 BG-11 培养液培养 15 d 以上,培养温度(20 ± 1) °C,光照 12L:12D。

1.2 实验方法

铜绿微囊藻对克氏原螯虾幼虾存活率的影响参照铜绿微囊藻水华中藻细胞的常见密度^[10-11],设定 1.0×10^6 , 5.0×10^6 , 1.0×10^7 /mL 3 个浓度研究铜绿微囊藻对克氏原螯虾幼虾存活率的影响。以煮沸消毒的淡水作为对照组,每组设 3 个重复。实验容器为 5 L 的方形塑料盒,实验液为 4 L。随机挑选 20 尾健康幼虾。每天定时投喂 2 次,2 d 更换一次藻液保证藻浓度稳定。以附肢是否动作为死亡标准,每天统计幼虾存活的数据。

铜绿微囊藻对克氏原螯虾幼虾肝胰腺超微结构的影响 将健康克氏原螯虾幼虾置于 5.0×10^6 , 1.0×10^7 , 2.0×10^7 /mL 浓度的铜绿微囊藻培养 7 d 后,将幼虾取出,无菌水冲洗后,解剖取出肝胰腺,先后经 2.5% 戊二醛、1% 锇酸固定,乙醇系列脱水。脱水后用环氧树脂 EPON812 包埋,LKB NOVA 型切片超薄片,醋酸铀和柠檬酸铅双染色,最后在加速电压为 75 kV 的 H-7000 (Hitachi, Japan) 透射电镜下观察细胞结构。

铜绿微囊藻对克氏原螯虾成虾几种酶活性的

影响 实验设铜绿微囊藻浓度为 1.0×10^6 , 5.0×10^6 , 1.0×10^7 /mL 的 3 个实验组,以及消毒淡水对照组,每组设 3 个重复。每组 60 尾健康成虾,随机养殖在 200 L 的塑料整理箱中,分别测定第 0、1、3、5、7 和 9 天时总血细胞密度(THCs),血清中血蓝蛋白含量,超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、酚氧化酶(PO)及鳃丝中的 Na^+/K^+ -ATP 酶活性。其中 THCs 参照姚翠鸾等^[12]的方法,PO 活性测定参照 ASHIDA^[13]的方法,血蓝蛋白含量测定结合 JOHNSON 等^[14]及章跃陵等^[15]的方法,由于血蓝蛋白在 280 和 334 nm 下波长上均有强的吸收峰,用分光光度计分别测定其在 280 和 334 nm 下光密度值 $\text{OD}_{280\text{nm}}$ 和 $\text{OD}_{334\text{nm}}$;SOD、POD、 Na^+/K^+ -ATPase 的测定采用南京建成公司的检测试剂盒。

2 结果

2.1 不同细胞密度铜绿微囊藻对克氏原螯虾幼虾存活率的影响

克氏原螯虾的幼虾存活率与本株实验用铜绿微囊藻密度有显著相关性,当藻细胞密度为 1.0×10^6 /mL 时,幼虾的存活基本不受影响,暴露 25 d 后才开始出现虾的死亡;试验结束时存活率为 95%,与对照组无明显性差异($P > 0.05$)。当藻细胞浓度达到 5.0×10^6 /mL 时,暴露 26 d 后存活率显著低于对照组($P < 0.05$),为 68.33%。藻细胞浓度达 1.0×10^7 /mL 时,暴露 19 d 后存活率仅为 61.67%,显著低于对照组($P < 0.05$);试验结束时存活率仅 48.33% (图 1)。

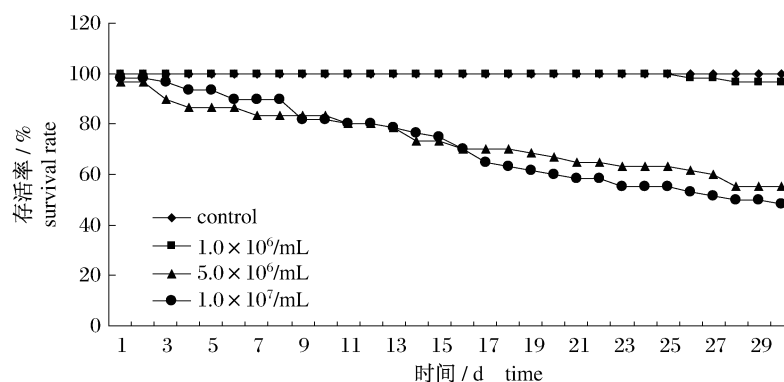


图 1 不同浓度的铜绿微囊藻对克氏原螯虾幼体存活率的影响

Fig. 1 Effect of different densities of *M. aeruginosa* on the survival rate of larvae *P. clarkia*

2.2 铜绿微囊藻对克氏原螯虾幼体外部形态及肝胰腺超微结构的影响

解剖镜下观察发现,与对照相比,克氏原螯虾幼体在不同浓度铜绿微囊藻暴露下,甲壳上斑点和体色有着一定差别。其中铜绿微囊藻浓度为 1.0×10^7 和 2.0×10^7 /mL 组幼体甲壳上的斑点变暗,体色加深。打开头胸甲发现,幼体肝胰腺在铜绿微囊藻暴露后出现不同程度的肿大现象,而 1.0×10^7 和 2.0×10^7 /mL 组,伴有体色变暗黑的

现象(图2)。

幼体肝胰腺超微结构观察结果显示,铜绿微囊藻浓度为 1.0×10^7 和 2.0×10^7 /mL 组幼体的肝胰腺细胞有受损现象(图3):细胞染色质向核膜周围聚拢;细胞核边集化;细胞质中出现大的空泡;细胞器受损。而对照组肝胰腺细胞则结构完整,染色质均匀分布,并可以观察到类似卵黄颗粒或脂肪粒的脂滴,藻浓度较低的为 5.0×10^6 /mL 组的肝胰腺细胞细胞膜相对完整,受损现象不明显。

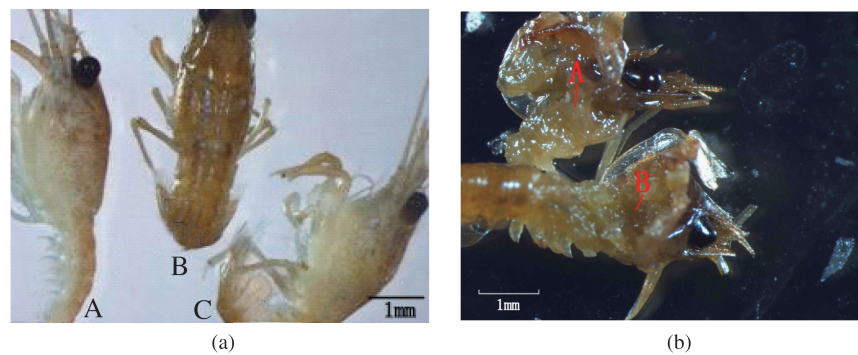


图2 铜绿微囊藻对克氏原螯虾幼体体色的影响

(a) 幼虾整体外部形态; (b) 肝胰腺。A:对照组, B: 1.0×10^7 /mL; C: 5.0×10^6 /mL。

Fig. 2 Effect of *M. aeruginosa* on body color of larvae *P. clarkii*

(a) morphology of the whole body; (b) hepatopancreas. A: control; B: 1.0×10^7 /mL; C: 5.0×10^6 /mL.

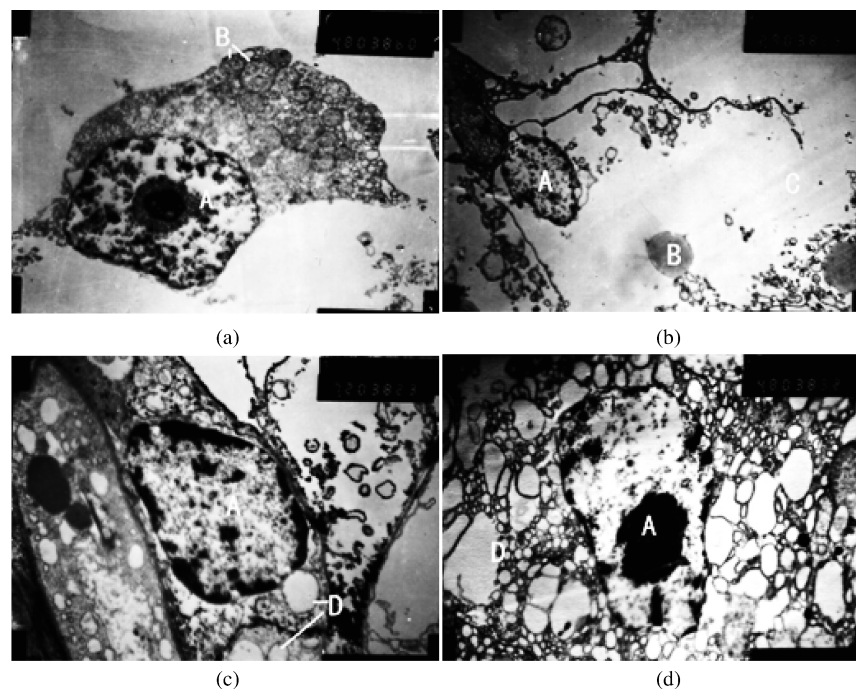


图3 克氏原螯虾幼体肝胰腺细胞超微结构

A:细胞核; B:细胞器或脂滴; C:细胞膜破裂处; D:细胞质之间的空泡。

Fig. 3 Ultrastructure of hepatopancreas of larvae *P. clarkii*

A: cell nucleus; B: cellular organelle/ lipid droplet; C: cell membrane breakage place; D: vacuoles between Cytoplasm.

2.3 铜绿微囊藻对克氏原螯虾成虾免疫相关酶类的影响

对总血细胞密度(THCs)的影响 随着浓度的增加,铜绿微囊藻对克氏原螯虾 THCs 的影响作用加强。对照组中,成虾 THCs 基本稳定在 $1.1 \times 10^7/\text{mL}$ 左右。加入藻液 24 h 后,各实验组成虾的 THCs 升高,其中浓度较高的 5.0×10^6 和 $1.0 \times 10^7/\text{mL}$ 组与对照组存在极显著性差异 ($P < 0.01$),而 $1.0 \times 10^6/\text{mL}$ 组在微囊藻作用 3 d 后才出现显著性升高。铜绿微囊藻暴露后实验组 THCs 持续稳定在较高水平(图 4)。

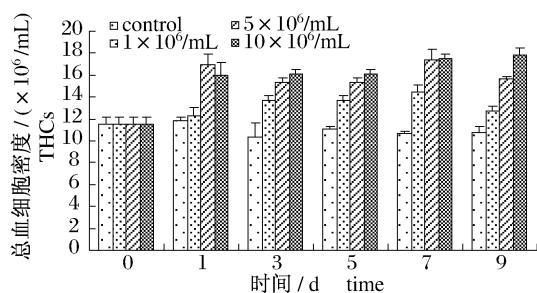


图 4 不同浓度铜绿微囊藻对克氏原螯虾总血细胞密度的影响

Fig. 4 Effect of *M. aeruginosa* on the THCs of adult crayfish *P. clarkii*

铜绿微囊藻对克氏原螯虾血蓝蛋白及 PO 的影响 铜绿微囊藻暴露 3 d 内,血清中血蓝蛋白的含量无显著性变化;5 d 后其含量显著性降低,其中浓度较高的两组中克氏原螯虾血蓝蛋白活性极显著低于对照组 ($P < 0.01$);随后血蓝蛋白含量恢复到对照组水平。在 280 及 334 nm 下血蓝蛋白含量的检测结果相似(图 5)。

图 6 显示铜绿微囊藻对克氏原螯虾 PO 活性的影响。从图中可以看出,置于 $1.0 \times 10^7/\text{mL}$ 铜绿微囊藻溶液中 1 d 后,血清中 PO 活性显著增加 ($P < 0.01$),但随后开始下降并最终恢复到初始值。 1.0×10^6 、 $5.0 \times 10^6/\text{mL}$ 组与对照组相比有所增强,但差异不显著。

铜绿微囊藻对克氏原螯虾血清中 SOD 及 POD 的影响 低浓度的铜绿微囊藻 (1.0×10^6 、 $5.0 \times 10^6/\text{mL}$) 对克氏原螯虾的 SOD 活性影响不明显,而高浓度的铜绿微囊藻 ($1.0 \times 10^7/\text{mL}$) 则显著抑制克氏原螯虾 SOD 活性(图 7)。铜绿微囊藻暴露 1 d 后, $1.0 \times 10^7/\text{mL}$ 组 SOD 活性略有下降;暴露 5 d 后 SOD 活性明显降低 ($P < 0.01$)。

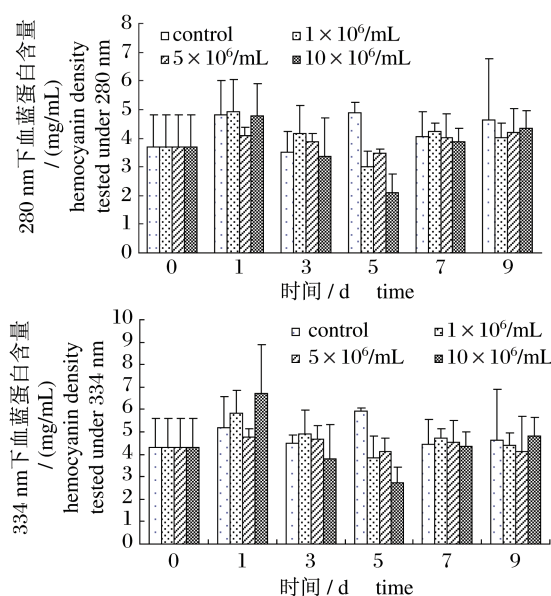


图 5 铜绿微囊藻作用后克氏原螯虾血清中血蓝蛋白浓度的变化

Fig. 5 Change of the density of hemocyanin in serum of adult crayfish *P. clarkii*

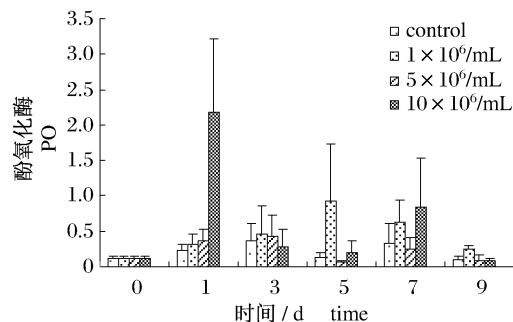


图 6 铜绿微囊藻对克氏原螯虾血清中 PO 活性的影响
Fig. 6 Effect of *M. aeruginosa* on the PO activities in serum of adult crayfish *P. clarkii*

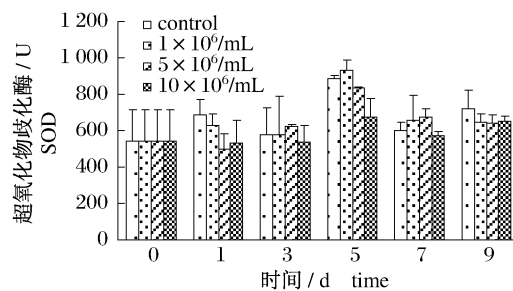


图 7 铜绿微囊藻对克氏原螯虾血清中 T-SOD 的影响
Fig. 7 Effect of *M. aeruginosa* on the T-SOD activities in serum of adult crayfish *P. clarkii*

成虾的 POD 活性受铜绿微囊藻作用后,基本呈现先升高,再下降的趋势。 $1.0 \times 10^7/\text{mL}$ 组

POD 活性在暴露 1 d 后显著增加 ($P < 0.05$), 1.0×10^6 和 5.0×10^6 /mL 组 POD 活性在暴露 3 d 后有所增加。随后各实验组均逐渐恢复到对照组水平(图 8)。

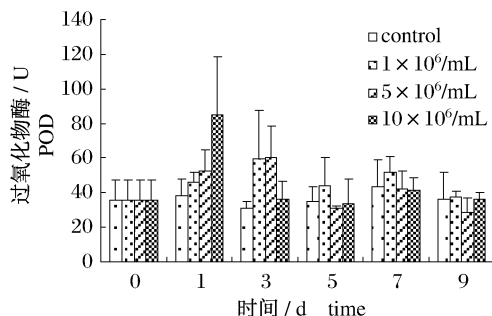


图 8 铜绿微囊藻对克氏原螯虾血清中 POD 的影响

Fig. 8 Effect of *M. aeruginosa* on the POD activities in serum of adult crayfish *P. clarkii*

铜绿微囊藻对克氏原螯虾鳃丝中 Na^+/K^+ -ATP 酶活性的影响 铜绿微囊藻对克氏原螯虾鳃丝中 Na^+/K^+ -ATP 酶活性的影响呈先降低后上升的趋势(图 9):暴露 1 d 后,3 个实验组 Na^+/K^+ -ATPase 活性均显著性降低,3 d 后,恢复初始值,随后逐渐增强,7 d 后增强到最高值,但到 9 d 后, Na^+/K^+ -ATPase 活性再次降低。

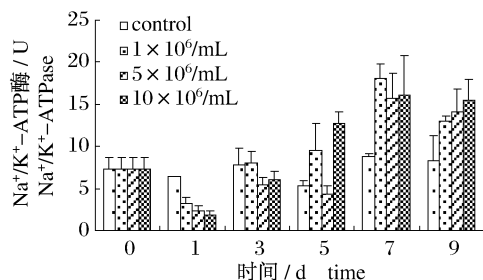


图 9 铜绿微囊藻对克氏原螯虾鳃丝中

Na^+/K^+ -ATPase 活性的影响

Fig. 9 Effect of *M. aeruginosa* on the Na^+/K^+ -ATPase activities in gill filament of adult crayfish *P. clarkii*

3 讨论

幼体阶段的克氏原螯虾成活率受水体中铜绿微囊藻的影响,这与目前报道的蓝藻水华水体中造成不同生物死亡的情况相符^[16-21],说明即使是耐受力极强的克氏原螯虾也受到铜绿微囊藻的影响。微囊藻毒素作为一种肝毒素,不仅造成肝脏肿胀淤血、肝体比重增加及一系列酶学变化,而且

还能诱导多种细胞凋亡^[22-24],并造成超微结构上骨架的破坏^[25]。本研究发现,将克氏原螯虾置于铜绿微囊藻溶液中 7 d 后幼体的肝胰腺出现了不同程度的肿胀及肝胰腺细胞坏死的现象,但没有发现凋亡小体的出现和细胞核的破裂的发生。幼体的肝胰腺细胞是受到高浓度的 MC 的强烈作用,出现细胞大量坏死的现象。而低浓度铜绿微囊藻是否能诱导虾类肝胰腺的细胞凋亡,需要进一步的研究。

甲壳动物中血细胞数量、PO 与免疫直接相关。血淋巴细胞在机体免疫系统中处于核心地位,THCs 在一定程度上反映机体的免疫应激能力或健康状况,并作为免疫指标之一用于衡量甲壳动物的免疫水平^[26]。在本研究中,铜绿微囊藻造成克氏原螯虾血细胞总数(THCs)一定程度的升高,表明该藻刺激了克氏原螯虾的免疫系统,产生更多的血淋巴细胞以抵抗不利环境。PO 是甲壳动物体液中重要的抗异物成分,是甲壳动物抵御外来侵害的第一道防线,其活性的高低是衡量免疫水平常用的因子。铜绿微囊藻暴露后 PO 活性显著增强,与雷志文等^[27]以及黄旭雄等^[26]报道的不同感染状态下造成 PO 活性增强的结果相似。血蓝蛋白是甲壳动物的呼吸色素,分散在血淋巴中,它具有输氧及免疫防御功能,它在一些物质的作用下可表现出类似于酚氧化酶的功能^[28]。YOGANANDHAN 等^[29]发现印度明对虾(*Penaeus indicus*)感染了 WSSV 后,血蓝蛋白比例显著减少,这一点与本实验结果一致,说明铜绿微囊藻能促使血蓝蛋白的分解,降低其输氧功能。铜绿微囊藻作为一种毒性较强的藻类,能克氏原螯虾免疫系统造成一定的危害,当其浓度达到一定范围后,能迅速刺激克氏原螯虾免疫体系,产生大量的血淋巴细胞、释放酚氧化酶类及类似的免疫因子参与免疫反应。

SOD、POD 等抗氧化酶类在生物体的解毒代谢中起重要作用。SOD 作为生物体内平衡氧化与抗氧化作用至关重要的酶类,其活性变化直接反映机体清除体内自由基的能力。研究表明,当水生生物处于不利环境中时,SOD 活性显著降低^[30-31]。本实验也发现,当克氏原螯虾暴露在铜绿微囊藻溶液中时,其 SOD 活性也显著降低,与孙舰军等^[32]关于氨氮对中国对虾抗病力的影响有相似的报告。POD 在生物体内主要是催化分

解氧化物或过氧化物,氧化分解毒素^[33-34]。在本实验中,克氏原螯虾血清中 POD 活性在高浓度铜绿微囊藻中暴露 1 d 后显著增加,表明铜绿微囊藻作用后机体内氧化物显著增多,机体产生大量 POD 用于清除体内过多的氧化物。抗氧化酶类活性的变化可能是由本株铜绿微囊藻产生的微囊藻毒素 MC-LR(本实验室高效液相色谱-质谱技术联用检测)通过细胞膜进入细胞后对细胞造成损伤引起的,当藻毒素进入细胞后能够引发细胞的氧化损伤、脂质过氧化、DNA 链的断裂以及蛋白质的氧化修饰等^[35-37]。

甲壳动物中,Na⁺/K⁺-ATPase 是重要的渗透压调节酶类,主要分布于鳃、肝胰腺和触角腺等组织,其活性是机体生理代谢和生长状况的重要指标^[38]。本实验中鳃丝中 Na⁺/K⁺-ATPase 活性变化与赵峰等^[39]报道的盐度对史氏鳟鳃 Na⁺/K⁺-ATPase 活性影响极为类似,可能是鳃直接与外界环境中的铜绿微囊藻接触后先是经历应激反应阶段,Na⁺/K⁺-ATPase 活性迅速下降,机体处在这种不利条件下,即进入主动调节阶段,Na⁺/K⁺-ATPase 活性显著增强,以及时调整细胞渗透压平衡,行使呼吸、排泄、渗透压调节及病害防御等功能,使机体逐步适应外界环境。

机体产生应激反应是对不良环境进行积极对抗的结果,当环境因子的突变超过甲壳动物能够承受的范围时,则发生代谢上的紊乱、渗透调节机制失去作用、免疫力下降,甚至死亡^[40]。当外界环境因子在生物体的承受范围之内时,其可表现出一定范围之内的缓冲应激能力,本实验结果也证实了这一点。克氏原螯虾幼体只有当铜绿微囊藻浓度达到 1.0×10^7 /mL 时才出现显著性死亡,说明其已经超出幼虾的承受范围;而克氏原螯虾成虾暴露在铜绿微囊藻溶液中后,几种酶类活性先表现出一定程度的增强或者减弱,但最终都稳定在一个范围之内,说明即使当铜绿微囊藻达到 1.0×10^7 /mL 时,克氏原螯虾成虾仍有较强的耐受性,在经历应激反应之后逐渐适应外界环境的变化。

感谢上海滩涂资源开发研究所沈弘总经理的支持,感谢上海海洋大学王春博士以及何岳峰、王佳琪同学在实验过程中给予的帮助。

参考文献:

- [1] 查广才,周昌清,牛晓光. 铜绿微囊藻对凡纳滨对虾低盐度养殖的危害研究[J]. 中山大学学报:自然科学版,2007,46(2):64-67.
- [2] 查广才,周昌清,黄建荣,等. 凡纳对虾淡化养殖虾池微型浮游生物群落及多样性[J]. 生态学报,2004,24(8):1752-1759.
- [3] 张维昊,徐小清,丘昌强. 水环境中微囊藻毒素研究进展[J]. 环境科学研究,2001,14(2):57-61.
- [4] REINIKAINEN M, MERILUOTO J A, SPOOF L, et al. The toxicities of a polyunsaturated fatty acid and a microcystin to *Daphnia magna* [J]. Environmental Toxicology, 2001,16(5):444-448.
- [5] ANDERSEN R J, LUU H A, CHEN D Z X, et al. Chemical and biological evidence links microcystins to salmon "netpen liver disease" [J]. Toxicon, 1993, 31(10):1315-1323.
- [6] ZURAWELL R W, CHEN H, BURKE J M, et al. Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments [J]. Journal of Toxicology and Environmental Health, 2004,8(1):1-37.
- [7] ORR P T, JONES G J, HUNTER R A, et al. Ingestion of toxic *Microcystis aeruginosa* by dairy cattle and the implications for microcystin contamination of milk [J]. Toxicon, 2001, 39(12):1847-1854.
- [8] PARK H D, SASAKI Y, MARUYAMA T, et al. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a hypertrophic lake [J]. Environmental Toxicology, 2001,16(4):337-343.
- [9] ZIMBA P V, CAMUS A, ALLEN E H, et al. Co-occurrence of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, mortalities and microcystin toxin in a southeastern USA shrimp facility [J]. Aquaculture, 2006,261(3):1048-1055.
- [10] 陆开宏,金春华,王扬才. 罗非鱼对蓝藻的摄食消化及对富营养化水体水华的控制 [J]. 水产学报, 2005,29(6):811-818.
- [11] VASCONCELOS V, OLIVEIRA S, TELES F O. Impact of a toxic and a non-toxic strain of *Microcystis aeruginosa* on the crayfish *Procambarus clarkii* [J]. Toxicon, 2001,39(10):1461-1470.
- [12] 姚翠鸾,吴长功,相建海. 灭活鳗弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 刺激后中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 血液抗菌活性的变化 [J]. 海洋与湖沼, 2007,38(1):1-7.

- [13] ASHIDA M. Purification and characterization of prophenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori* [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1971, 144(2): 749 - 762.
- [14] JOHNSON B A, BONAVENTURA C, BONAVENTURA J. Allosteric modulation of *Callinectes sapidus* hemocyanin by binding of L-lactate [J]. Biochemistry, 1984, 23(5): 872 - 878.
- [15] 章跃陵, 王三英, 刘光明, 等. 南美白对虾血蓝蛋白对酚氧化酶活性的影响 [J]. 中国水产科学, 2005, 12(4): 402 - 406.
- [16] BABICA P, BLAÁHA L, MARŠÁLEK B. Exploring the natural role of microcystins-a review of effects on photoautotrophic organisms [J]. Journal of Phycology, 2006, 42(1): 9 - 20.
- [17] ZIMBA P, KHOO L, GAUNT P S, et al. Confirmation of catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), mortality from Microcystis toxins [J]. Journal of Fish Diseases, 2001, 24(1): 41 - 47.
- [18] XIE L, XIE P, OZAWA K, et al. Dynamics of microcystins-LR and-RR in the phytoplanktivorous silver carp in a sub-chronic toxicity experiment [J]. Environmental Pollution, 2004, 127(3): 431 - 439.
- [19] OBEREMM A, BECKER J, CODD G A, et al. Effects of cyanobacterial toxins and aqueous crude extracts of cyanobacteria on the development of fish and amphibians [J]. Environmental Toxicology, 1999, 14(1): 77 - 88.
- [20] YOKOYAMA A, PARK H D. Mechanism and prediction for contamination of freshwater bivalves (Unionidae) with the cyanobacterial toxin microcystin in hypereutrophic Lake Suwa, Japan [J]. Environmental Toxicology, 2002, 17(5): 424 - 433.
- [21] YOKOYAMA A, PARK H D. Depuration kinetics and persistence of the cyanobacterial toxin microcystin-LR in the freshwater bivalve *Unio douglasiae* [J]. Environmental Toxicology, 2003, 18(1): 61 - 67.
- [22] AMORIM A, VASCONCELOS V V. Dynamics of microcystins in the mussel *Mytilus galloprovincialis* [J]. Toxicon, 1999, 37(7): 1041 - 1052.
- [23] 傅文字, 李敏伟, 陈加平, 等. 一种检测微囊藻毒素LR诱导大鼠肾细胞凋亡的方法 [J]. 水生生物学报, 2004, 28: 101 - 102.
- [24] LANKOFF A. The uptake kinetics and immunotoxic effects of microcystin-LR in human and chicken peripheral blood lymphocytes *in vitro* [J]. Toxicology, 2004, 204(1): 23 - 40.
- [25] BEASLEY V R, LOVELL R A, HOLMES K R, et al. Microcystin-LR decreases hepatic and renal perfusion, and causes circulatory shock, severe hypoglycemia, and terminal hyperkalemia in intravascularly dosed swine [J]. Journal of Toxicology and Environmental Health, 2000, 61(4): 281 - 303.
- [26] 黄旭雄, 周洪琪, 宋理平. 急性感染对中国明对虾非特异免疫水平的影响 [J]. 水生生物学报, 2007, 31(3): 325 - 331.
- [27] 雷质文, 黄捷, 杨冰, 等. 感染白斑综合症病毒(WSSV)对虾相关免疫因子的研究 [J]. 中国水产科学, 2001, 8(4): 46 - 51.
- [28] ADACHI K, HIRATA T, NISHIOKA T, et al. Hemocyte components in crustaceans convert hemocyanin into a phenoloxidase-like enzyme [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2003, 134(1): 135 - 141.
- [29] YOGANANDHAN K, THIRUPATHI S, HAMEED A S. Biochemical, physiological and hematological changes in white spot syndrome virus-infected shrimp, *Penaeus indicus* [J]. Aquaculture, 2003, 221(1-4): 1 - 11.
- [30] 呼光富, 李忠, 梁宏伟, 等. 镉对克氏原螯虾肝胰腺触角腺及鳃中SOD和CAT活性的影响 [J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(9): 1806 - 1811.
- [31] 张静, 王军霞, 张亚娟, 等. 饥饿对日本沼虾代谢及SOD活性的影响 [J]. 河北大学学报: 自然科学版, 2007, 27(5): 537 - 540.
- [32] 孙舰军, 丁美丽. 氨氮对中国对虾抗病力的影响 [J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(3): 267 - 272.
- [33] ASHIDA M, SÖDERHÄLL K. The prophenoloxidase activating system in crayfish [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Comparative Biochemistry, 1984, 77(1): 21 - 26.
- [34] SÖDERHÄLL K, CERENIUS L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity [J]. Current Opinion in Immunology, 1998, 10(1): 23 - 28.
- [35] 樊有赋, 詹寿发, 甘金莲, 等. 微囊藻毒素的危害及其防治 [J]. 生命的化学, 2008, 28(1): 101 - 103.
- [36] 陈国永, 杨振波, 陶茂萱. 淡水微囊藻毒素毒理学研究进展 [J]. 卫生研究, 2006, 35(1): 120 - 122.
- [37] DING W, SHEN H, ONG C. The critical role of ROS and mitochondrial membrane permeability in microcystin-LR induced rapid apoptosis in primary rat hepatocytes [J]. Hepatology, 2000, 32(3):

- 547 - 555.
- [38] 潘鲁青,刘泓宇. 甲壳动物渗透调节生理学研究进展[J]. 水产科学,2005,29(1):109 - 115.
- [39] 赵峰,庄平,章龙珍. 盐度驯化对史氏鲟鳃 Na^+ - K^+ -ATP 酶、血清渗透压及离子浓度的影响[J]. 水产学报,2006,30(4):444 - 449.
- [40] 郭春雨,管越强,刘波兰. 温度、pH 和盐度对克氏原螯虾鳃 Na^+ - K^+ -ATPase 活性的影响[J]. 动物学杂志,2007,42(6):96 - 102.

Effects of *Microcystis aeruginosa* on survival of juvenile crayfish and on enzymes activity of adult crayfish (*Procambarus clarkii*)

YUE Ya-ling¹, LIU Li-ping^{1*}, LI Kang¹, YAN Jun¹, DIANA J S²

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. School of Natural Resources and Environment, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA)

Abstract: In this paper, larvae of crayfish *Procambarus clarkii* were exposed to different concentrations of *M. aeruginosa* (1.0×10^6 , 5.0×10^6 , 1.0×10^7 and 2.0×10^7 /mL) to investigate their impacts on survival and the hepatopancreas ultrastructure of the crayfish. At the same time, adult crayfish were exposed to the same different concentrations of *M. aeruginosa* and the total hemocyte counts density (THCs), content of hemocyanin in the serum, superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), phenoloxidase (PO) and Na^+ / K^+ -ATPase in the gill filament were detected. The result shows that: (1) *M. aeruginosa* can significantly reduce the survival rate of crayfish larvae. When algae cells reached 1.0×10^7 /mL, the survival rate was significantly lower than that of the control group on the 19th day ($P < 0.05$). When the experiment finished, the survival rate was 48%. (2) The hepatopancreas of crayfish larvae became darkened and hepatopancreas cells were observed to be damaged under the transmission electron microscopy. (3) When exposed to the highest concentration of *M. aeruginosa*, crayfish acted a stress reaction: THCs of the adult crayfish increased significantly and stayed at a high level after being exposed for 1 d. There were not significant differences for hemocyanin content at the beginning while significantly decreased on 5 d ($P < 0.05$). The activity of T-SOD in serum was inhibited after 1 d, and was activated to a high level on 5 d. The activity of POD and PO showed fluctuation trend. The activity of Na^+ / K^+ -ATPase in gill dropped significantly after 1 d ($P < 0.01$), then increased and stayed at a higher level finally. The result indicated that *M. aeruginosa* has negative impact on the survival of the juvenile crayfish and affects immunity of the adult crayfish which may cause loss of output of crayfish.

Key words: *Microcystis aeruginosa*; crayfish (*Procambarus clarkii*); survival rate; ultrastructure; enzymes

Corresponding author: LIU Li-ping. E-mail: lp-liu@shou.edu.cn