

文章编号: 1000-0615(2016)09-1486-11

DOI: 10.11964/jfc.20150409846

## 缺氧和有毒微囊藻胁迫下三角帆蚌鳃和主要消化器官以及晶杆体的扫描电镜观察

顾叶丹, 尚跃勇, 袁明哲, 陈雪英, 周作强, 胡梦红\*

(上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

**摘要:** 为了阐明缺氧和有毒铜绿微囊藻对三角帆蚌鳃和主要消化器官的毒理效应和组织病理, 实验利用扫描电镜研究了暴露于缺氧和有毒铜绿微囊藻下三角帆蚌的鳃、胃、肠以及晶杆体等器官组织病理学变化。结果显示, 从第7天开始缺氧和有毒藻类复合胁迫组三角帆蚌的鳃丝及柱状细胞出现大量坏死和脱落, 胃肠腔面纤毛脱落、上皮细胞破裂坏死, 晶杆体在第5天已经完全消失; 第7天单独缺氧组和单独有毒藻类组的鳃和消化道出现少量的病变, 单独缺氧组晶杆体在第7天完全消失, 单独有毒藻类组晶杆体则一直存在。胁迫消失后, 3个实验暴露组的晶杆体都未恢复正常对照组水平, 因此缺氧和有毒铜绿微囊藻对三角帆蚌鳃和消化系统产生不可恢复性损伤, 双重胁迫组影响最为严重, 缺氧胁迫组相对有毒铜绿微囊藻胁迫组影响更为显著。本研究为三角帆蚌在缺氧和有毒藻类胁迫下的生理适应机制提供了组织病理学上的参考, 并为其作为富营养化水体治理工具种的可行性提供了理论依据。

**关键词:** 三角帆蚌; 有毒铜绿微囊藻; 晶杆体; 鳃结构; 缺氧; 扫描电镜

**中图分类号:** S 917.4

**文献标志码:** A

三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)是我国特有的淡水经济贝类。近年来, 基于三角帆蚌对藻类的滤食和水华因子的调控作用, 已有学者提出将三角帆蚌作为水域环境的工具种用于富营养化水体的生态修复, 并取得了一定的效果<sup>[1-3]</sup>, 但作为水域生态修复工具种的可行性还存在一定争议<sup>[4]</sup>。有研究证实, 三角帆蚌对高浓度的铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)存在较强的胁迫反应<sup>[5]</sup>。更值得注意的是, 对水生动物而言, 富营养化严重的水体中最主要的两大胁迫因子即缺氧和有害水华藻类<sup>[6]</sup>。这两种胁迫因子常常相伴出现, 对水生动物产生双重胁迫作用。

王芳等<sup>[7]</sup>的研究表明, 鳃不仅是双壳贝类的呼吸器官, 还是其重要的滤食性器官, 而对于雌蚌, 外鳃腔同时还是受精卵发育的场所<sup>[8]</sup>, 因此, 鳃对双壳类的生存以及繁殖都起到了至

重要的作用。

双壳贝类的前肠内有一棒状胶质结构——晶杆体(crystalline style), 因此前肠又叫晶杆囊。晶杆体头部不仅能高速旋转与胃壁相研磨, 对胃内食物进行搅拌研磨以及粗细分类, 还能溶解释放消化酶进入胃腔, 对食物进行胞外消化作用<sup>[9]</sup>, 因此, 晶杆体在食物的细胞外消化和食物分拣过程中具有至关重要的作用<sup>[10-11]</sup>。

近年来, 国内外有关双壳贝类晶杆体及其鳃组织结构的研究已有诸多报道<sup>[7, 10, 12-16]</sup>。但有关缺氧和有毒铜绿微囊藻双重胁迫对双壳贝类晶杆体及鳃结构的影响的研究还鲜见报道。本实验通过研究缺氧和有毒铜绿微囊藻双重胁迫对三角帆蚌晶杆体及鳃结构的影响, 为三角帆蚌作为水域环境生态修复工具种可行性的评估工作积累基础资料。

收稿日期: 2015-04-22 修回日期: 2016-07-05

资助项目: 国家自然科学基金(31202015); 上海市高校知识服务平台项目(ZF1206)

通信作者: 胡梦红, E-mail: mhhu@shou.edu.cn

## 1 材料及方法

### 1.1 实验材料

实验用三角帆蚌购自金华武义, 三角帆蚌为2龄健康的未插片蚌, 平均壳长为(102.35±6.81) mm, 平均壳宽为(25.52±1.86) mm, 平均湿重为(97.05±16.62) g。三角帆蚌取回后洗刷去除表面附着物, 于室内水族箱(120 cm×60 cm×60 cm)中暂养5 d, 期间每天投喂足量( $1 \times 10^5$ 个/mL)的普通小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*), 连续充气, 并逐步升温进行温度驯化, 以达到实验所需温度(20 °C)。

有毒铜绿微囊藻(905)和小球藻, 藻种均购自中科院水生所淡水藻种库, 由本实验室自行培养扩大, 以达到实验所需数量。

### 1.2 实验方法

本实验于2013年3月24日在上海海洋大学养殖实验室开始进行。实验中水体溶解氧含量和有毒微囊藻密度根据不同富营养化程度的自然水体中相应量而设定<sup>[17-18]</sup>, 溶解氧设两个水平: 1.0 mg/L和6.0 mg/L; 有毒铜绿微囊藻(toxic *M. aeruginosa*, TM)密度设两个水平:  $1 \times 10^7$ 个/mL和0个/mL, 根据正交设计原理设4个处理组: 其中A组为缺氧和有毒微囊藻富营养化组, B组为缺氧组, C组为有毒微囊藻富营养化组, D组为对照组。

表1 实验组设计

Tab. 1 The design of the experimental group

参数 parameters	实验组 experimental group			
	A	B	C	D
溶解氧(mg/L) DO	1.0	1.0	6.0	6.0
有毒微囊藻密度/(个/mL) TM	$1 \times 10^7$	0	$1 \times 10^7$	0

无有毒微囊藻组用密度为 $1 \times 10^7$ 个/mL小球藻代替, 以保证每个处理组具有相同的饵料密度<sup>[19]</sup>。每个处理组3个平行, 实验开始前24 h, 挑选出规格一致喷水有力的三角帆蚌, 随机分配到4个处理组共12个玻璃水族缸中(20 cm×20 cm×30 cm), 每个玻璃水族缸放入8个蚌。实验期间水体溶解氧水平的维持通过全自动台式溶氧控制仪(Cole-parmer 01972-00)对氮气和空气充入量的控制来实现<sup>[20]</sup>, 每天换水1/4, 换水的同时清

除三角帆蚌代谢所产生的粪便, 根据每个水族缸的摄食情况添加相应量的藻, 以使各处理组藻密度维持在实验设定水平。

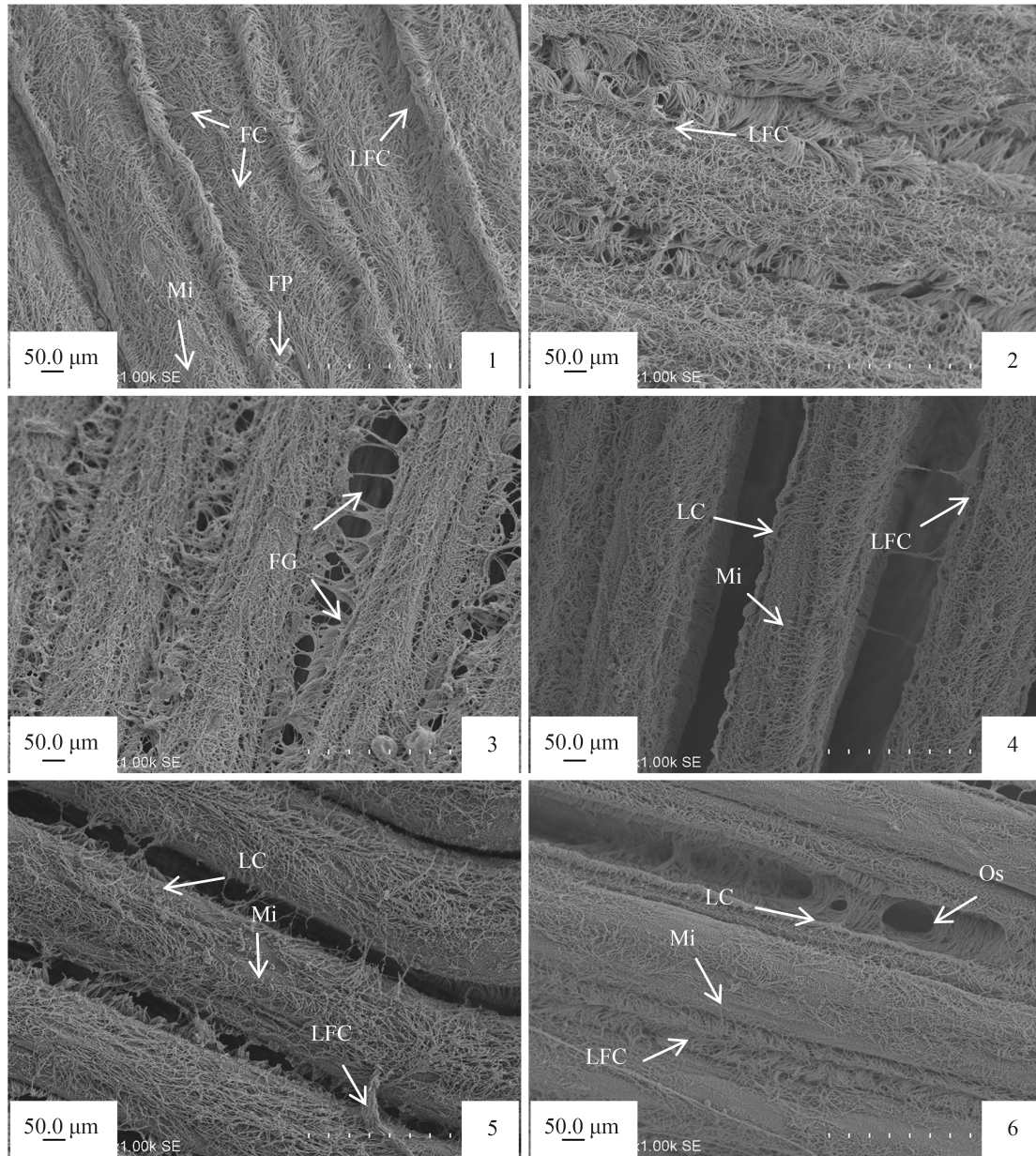
实验开始后第0, 3, 5, 7, 14, 21天分别从12个水族缸中随机取出一个三角帆蚌刷洗去表面附着物后, 置于冰盘上, 用酒精消毒后的美工刀沿蚌壳一侧切断前后闭壳肌, 打开蚌壳, 在一侧外鳃中部迅速用解剖剪沿外鳃基部剪下一小片外鳃(宽约4 mm), 然后依次取胃壁、晶杆体、前肠(位于足内)、中肠(位于围心腔内)和直肠(靠近肛门), 用0.1 mol/L MPB(phosphate buffer)洗去粪便污垢及黏液后, 迅速投入到装有Karnovsky固定液的样品瓶中, 固定液的量应不小于样品量的20倍, 然后放置在4 °C冰箱内避光固定48 h, 乙醇梯度脱水, 乙酸异戊酯置换, CO<sub>2</sub>临界点干燥(EMITECH-K850), 喷金(HITACHI-E1010), 扫描电镜(HITACHI-S-3400N)观察并拍照。

## 2 结果

### 2.1 溶解氧和有毒铜绿微囊藻对三角帆蚌鳃组织结构的影响

三角帆蚌鳃丝上的前纤毛、前侧纤毛、侧纤毛、微绒毛、鳃孔、食物沟以及食物颗粒清晰可见。实验早期0~5天, A组鳃丝结构均未出现显著的病理变化(图版 I -1~3), 第5天, 有少量前纤毛出现剥落现象; 到第7天, A组鳃丝前纤毛开始出现明显的脱落现象, 前纤毛脱落后原先被覆其下的微绒毛大面积暴露出来, 相邻两鳃丝变形分离, 前侧纤毛大量剥落, 相邻鳃丝前侧纤毛搭接处断裂分离, 此时, 通常被前侧纤毛覆盖的侧纤毛也出现在视野下, 同时还可可见鳃孔入口(图版 I -4); 第14天, 鳃丝前纤毛脱落更为显著, 未脱落的前纤毛卷曲黏连甚至成团, 微绒毛大面积暴露在外, 直接与食物颗粒相接触摩擦, 前侧纤毛显著脱落变稀, 部分鳃丝前侧纤毛甚至被剥光, 根本无法与相邻鳃丝的前侧纤毛相互搭接形成完整的网状结构(图版 I -5); 第21天, 鳃丝前纤毛脱落更为显著, 脱落面积达到50%以上, 未脱落的前纤毛“酥软匍匐”在鳃丝上, 有一定数量鳃丝的前侧纤毛完全脱落, 值得注意的是, 此时塞孔处的侧纤毛异常发达(图版 I -6)。

实验第7天, A组鳃丝有一定数量柱状细胞出现凋亡坏死, 而B组和C组鳃丝仅个别纤毛柱



图版 I A组三角帆蚌鳃结构的扫描电镜观察

1~6分别是正常鳃, 实验第3天, 第5天, 第7天, 第14天, 第21天鳃的扫描电镜图, ×1.00 k, 标尺=50.0 μm; LC.侧纤毛; FC.前纤毛; LFC.前侧纤毛; Mi.微绒毛; Os.鳃孔; FP.食物颗粒; FG.食物沟

Plate I Scanning electron microscope observation on the gill structure of the group A

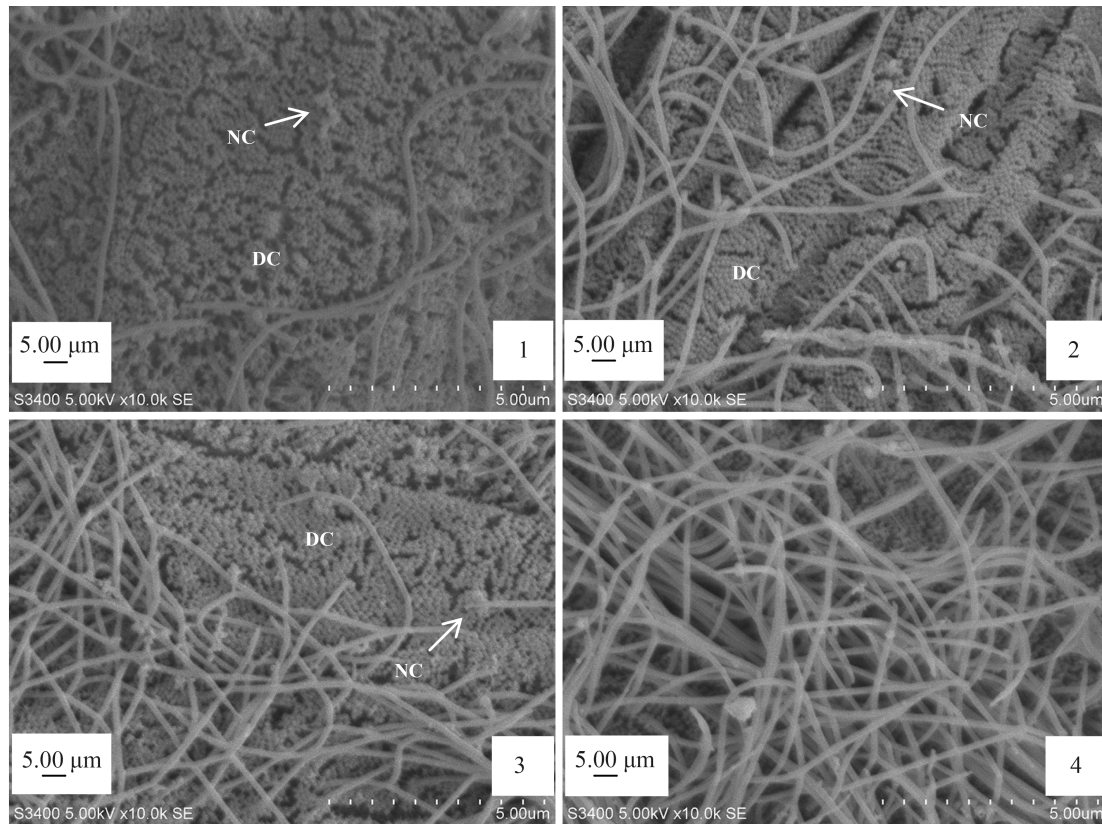
1-6 are the normal gill of the mussel, the gills after 3 days, 5 days, 7 days, 14 days and 21 days experiment under the scanning electron microscope.×1.00 k, Scaleplate=50.0 μm. LC. Lateral Cilium, FC. Frontal Cilium, LFC. Laterofrontal Cilium, Mi. Microvillus, Os. Opercular spiracle, FP. Food Particles, FG. Food Groove

状细胞出现坏死; A组鳃丝纤毛脱落程度显著高于B组和C组; 而B组与C组之间没有显著差异, D组鳃丝未发现明显的病理变化(图版 II)。

2.2 水体溶解氧含量和有毒微囊藻密度对三角帆蚌主要消化器官的影响

第7天, A组胃腔面上清晰可见密布的微绒

毛, 局部地区微绒毛出现脱落, 也能发现胃腔面破裂的现象(图版 III -1); B组胃腔面可见呈棒状突起的分泌细胞, 覆盖在分泌细胞细胞上的是一层网状的疑似消化酶的黏液物质, 依稀可见圆形颗粒物质或为食物颗粒, 紧贴胃腔面的微绒毛排列紧密未见脱落或破裂现象(图版 III -2)。第7天, A组前肠腔面纤毛上附着大量的椭圆



图版 II 第7天各处理组三角帆蚌鳃组织结构变化的扫描电镜观察

1-4分别是第7天A、B、C、D组的蚌鳃,  $\times 10.0k$ , 标尺=5.00  $\mu m$ ; DC:纤毛脱落; NC:坏死细胞

**Plate II Scanning electron microscope observation on the gill structure of seventh day in each treatment group**

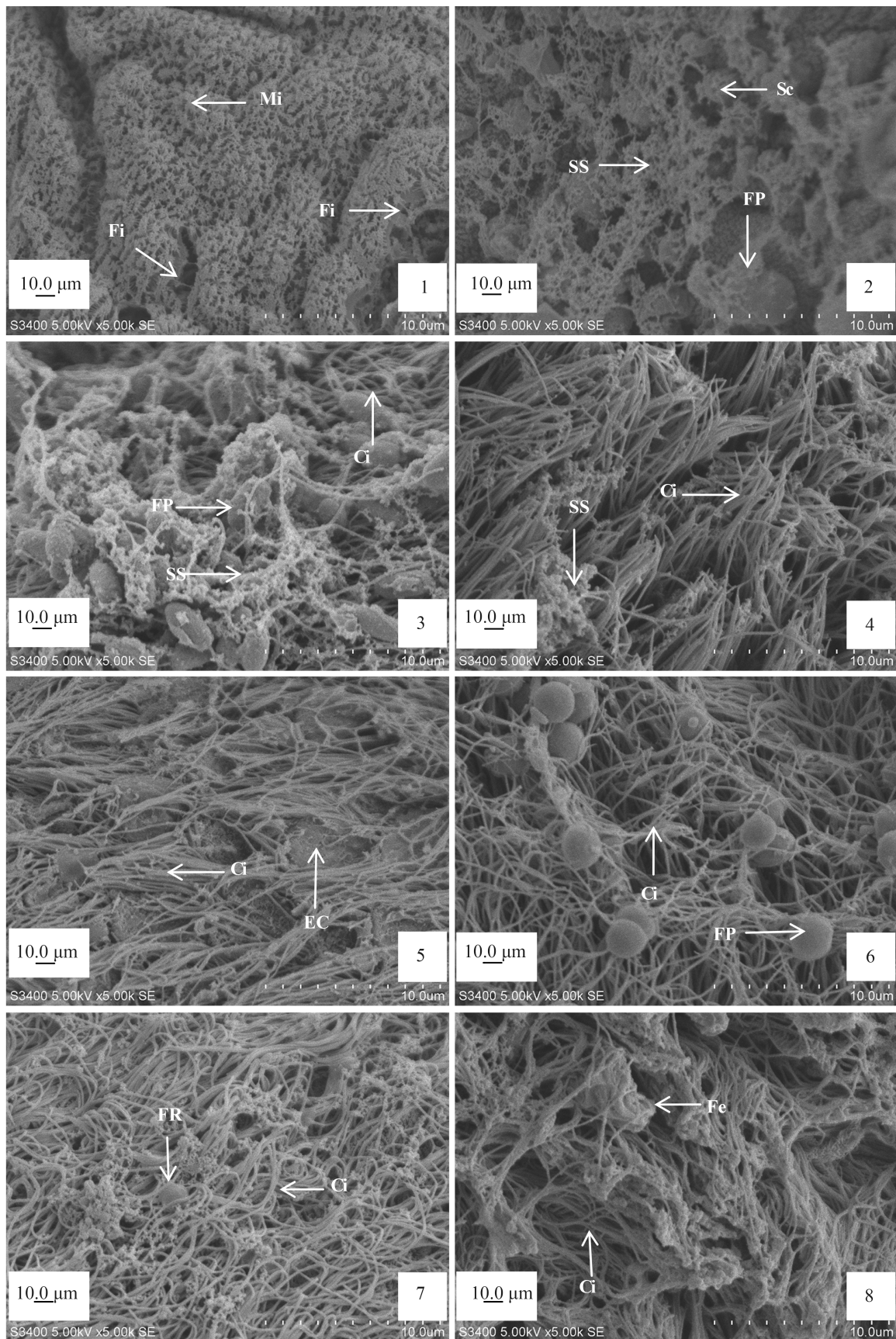
1-4 are the gills of mussel from Group A, B, C and D after 7 days experiment under the scanning electron microscope.  $\times 10.0k$ , Scaleplate=5.00  $\mu m$ . DC: Deciduous Cilium, NC: Necrosis Cells

形食物颗粒和黏液物质, 以致肠纤毛伏在腔面上(图版 III-3); B组前肠腔面只有少量食物颗粒, 而且食物颗粒个体显著小于A组, 纤毛附着少量黏液物质直立于肠腔面上, 便于摆动(图版 III-4)。第7天, A组中肠腔面较大面积腔面纤毛出现脱落, 露出肠腔面上皮细胞, 甚至有部分上皮细胞破裂坏死, 未见黏液物质及食物颗粒附着(图版 III-5); 第7天, B组中肠腔面纤毛完整, 仅少量黏液物质和食物颗粒附着(图版 III-6)。第7天, A组直肠纤毛卷曲匍匐在腔面上, 其上附着少量未完全消化的食物残渣还有少量黏液物质(图版 III-7); 第7天, B组可见大量的粪便覆盖在纤毛上, 导致纤毛相互粘连(图版 III-8)。

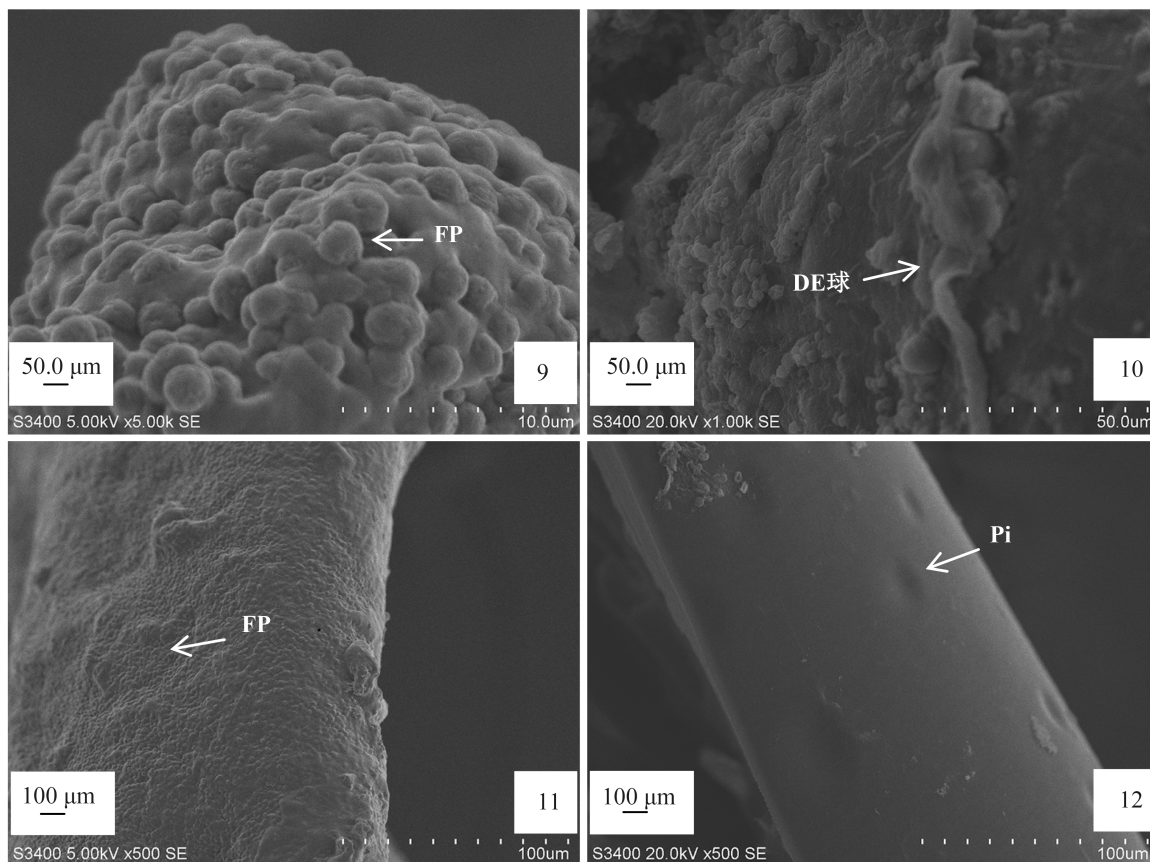
### 2.3 水体溶解氧含量和有毒微囊藻密度对三角帆蚌晶杆体的影响

第0天, 各组三角帆蚌均存在晶杆体, 也即晶杆体存在比例为100%; 到第3天, 各处理组均有少量的蚌出现晶杆体消融现象, 但铜绿微囊

藻组A组和C组较其他两组更显著, 存在比例均为66.7%; 到第5天, A组三角帆蚌几乎均未找到晶杆体, 晶杆体存在比例为0, C组也仅有个别蚌能找到晶杆体, 晶杆存在比例为33.3%, 然后B组为66.7%, D组为83.3%; 到第7天, A组和B组晶杆体存在比例为0, D组晶杆体的存在比例稍有下降, 为66.7%, 值得注意的是, 此时C组晶杆体的存在比例出现显著上升, 由0上升到了83.3%; 到第14天, A组和B组晶杆体存在比例没有显著变化, C组比例有所下降, 而D组晶杆体存在比例稍有上升; 第14天, 将各组三角帆蚌转移到D组环境下后, 第15天, 除C组三角帆蚌晶杆体存在比例出现下降外, 其余各处理组均出现显著上升, 此时, 原A组和B组的三角帆蚌晶杆体存在比例均为66.7%; 但到第21天, A组和B组三角帆蚌晶杆体存在比例又出现显著下降, 原A组三角帆蚌降至33.3%, 而原B组三角帆蚌降至50%, 此时原C组三角帆蚌这一比例仍为50%(表2)。



(图版 III Plate III)



图版 III 第7天各处理组三角帆蚌胃、肠和晶杆体结构的扫描电镜观察

1, 3, 5, 7分别是第7天A组的胃, 前肠, 中肠和直肠; 图中2, 4, 6, 8分别是第7天B组的胃, 前肠, 中肠和直肠; 图中9, 11分别是第7天C组晶杆体头部和杆部; 图中10, 12分别是第7天D组晶杆体头部和杆部。只有10是×1.00 k, 标尺=50.0 um, 其余都是×5.00 k, 标尺=10.0 um。SC.分泌细胞; EC.上皮细胞; Ci.纤毛; Fi.裂缝; FP.食物颗粒; DE球.消化酶和食物颗粒; Mi.微绒毛; SS.粘液物质; FR.食物残渣; Fe.粪便; Pi.坑

**Plate III Scanning electron microscopic observation on the seventh day of each treatment group *H. cumingii* stomach and intestine and the crystal rod structure**

1, 3, 5, 7 are the stomach, foregut, midgut and rectum of the mussel from Group A after 7 days experiment under the scanning electron microscope, respectively. Number 2, 4, 6, 8 are the stomach, foregut, midgut and rectum of the mussel from Group B after 7 days experiment under the scanning electron microscope, respectively. Number 9, 11 are the head and the hoesel of the crystalline style from Group C after 7 days experiment under the scanning electron microscope, respectively. Number 10, 12 are the head and the hoesel of the crystalline style from Group D after 7 days experiment under the scanning electron microscope, respectively. Only Number 10 is ×1.00 k, Scaleplate=50.0 μm, others are ×5.00 k, Scaleplate=10.0 μm. SC. secretory cell, EC. epithelial cell, Ci. cilium, Fi. fissure, FP. food particles, DE ball. digestive enzymes and food particles, Mi. microvillus, SS. slime substance, FR. food residue, Pi. pit

表 2 各实验处理组晶杆体存在比例  
Tab. 2 The existence proportion of crystal rod in each experimental group

实验组 experiment group	实验天数/d test day							%
	0	3	5	7	14	15	21	
A	100	66.7	0	0	0	66.7	33.3	
B	100	83.3	66.7	0	0	66.7	50	
C	100	66.7	33.3	83.3	66.7	50	50	
D	100	83.3	83.3	66.7	83.3	100	83.3	

第7天, C组晶杆体头部表面凹凸不平, 内部食物颗粒突出晶杆体(图版Ⅲ-9); 第7天, D组晶杆体头部表面相对光滑, 有少量消化酶和食物颗粒附着在周围(图版Ⅲ-10)。第7天C组晶杆体杆部表面同样凹凸不平, 杆部侧扁, 大量球形食物颗粒暴露在晶杆体外表面上(图版Ⅲ-11); 第7天D组晶杆体杆部表面非常光滑, 仅外周有少量微微凹陷的坑(图版Ⅲ-12)。

### 3 讨论

#### 3.1 三角帆蚌的鳃

鳃是贝类主要的滤食器官, 同时也是呼吸器官, 对于部分种类的雌蚌来说更是繁殖器官<sup>[7, 12-13, 21]</sup>, 因此一些毒理和病理实验中鳃丝表面结构的变化常作为衡量贝类健康是否受损的一个重要指标<sup>[14-15]</sup>。有研究表明, 鳃丝前纤毛主要与鳃表面上食物颗粒的运输有关<sup>[22-23]</sup>, 而相邻鳃丝的前侧纤毛相互搭接形成的完整过滤网, 对食物颗粒起到过滤筛选的作用<sup>[7, 23-25]</sup>。本实验中, 鳃丝前纤毛、前侧纤毛、侧纤毛和微绒毛等表面结构在鳃组织扫描电镜图片中清晰可见, 第7天缺氧和有毒铜绿微囊藻处理组A组鳃丝前纤毛出现显著脱落, 相邻两鳃丝变形分离, 前侧纤毛搭接处断裂, 部分鳃丝分泌细胞坏死, 说明缺氧和有毒铜绿微囊藻可能导致鳃丝滤水和食物筛选的功能障碍或丧失; 随着处理时间的延长, 这种损伤越发显著, 到第14天, 未脱落的前纤毛卷曲粘连甚至成团, 前侧纤毛显著变短甚至成片剥落, 已无法与相邻鳃丝的前侧纤毛相互搭接形成完整的网状结构。值得注意的是, 当鳃丝前侧纤毛几乎剥落殆尽时, 鳃孔处的侧纤毛异常发达, 代替前侧纤毛起到一定的滤食作用, 这可能是鳃丝的一种自我保护机制在起作用。这一结果与Gregory等<sup>[14]</sup>关于汞暴露对翡翠贻贝(*Perna viridas*)影响的研究结果相吻合, 本实验中, 第7天A组鳃丝的受损程度显著高于B组和C组, 而B组和C组之间差异不显著, 仅有少量的纤毛脱落和个别上皮细胞凋亡, 说明缺氧和有毒铜绿微囊藻在对鳃丝表面结构的影响上存在显著的交互作用, 原因可能与鳃丝的功能有关, 因为鳃丝既是贝类从水体中获取氧气的呼吸器官同时也是滤食水体中食物颗粒的重要器官, 当水体中含有有毒铜绿微囊藻时, 贝类的本

能反应就是闭壳拒食<sup>[26]</sup>, 但鳃丝为了从缺氧的水体中获取足够氧气, 贝类除了提高鳃丝血细胞携氧能力外<sup>[27]</sup>, 最直接的办法就是加大滤水率, 这样不仅需要消耗更多的能量, 更重要的是大量有毒铜绿微囊藻将被鳃丝滤食, 从而导致三角帆蚌鳃组织更大的伤害。

#### 3.2 三角帆蚌的主要消化器官

欧阳珊等<sup>[28]</sup>对贝类消化系统主要器官进行扫描电镜观察发现, 胃黏膜上皮重叠褶皱, 有利于增加胃的容积和表面积, 以及食物的消化, 而胃肠上皮的柱状细胞均有纤毛和微绒毛。胃肠腔内纤毛具有分拣食物、转移食物, 以及排出粪便等功能<sup>[29]</sup>, 前肠腔内纤毛还具有推动晶杆体旋转的功能<sup>[10]</sup>, 而微绒毛有助于缓解黏膜上皮的机械损伤, 保留分泌细胞的分泌物以及增加食物吸收表面积等。各段消化管上皮均有分泌细胞, 在扫描电镜下分泌细胞呈各种形态, 这些形态和分泌细胞的分泌过程有关, 肠管腔面上棒状或带状突起是分泌细胞释放出分泌物后留下的形态<sup>[28]</sup>。本实验中, 第7天A组三角帆蚌胃壁上可见少量微绒毛脱落以及胃壁破裂等病变, 而B组胃壁与正常三角帆蚌没有显著差异, 可见密布的微绒毛以及附着在上面的分泌物, 还有球状分泌细胞, 说明只有缺氧和有毒铜绿微囊藻协同作用才能对胃表面结构造成显著影响。本实验中, 三角帆蚌前肠到直肠的上皮细胞中都布满纤毛, 这与欧阳珊等<sup>[28]</sup>对三角帆蚌消化系统扫描电镜观察的结果相符。第7天A组前肠腔面纤毛上附着大量的椭圆形食物颗粒和黏液物质, 肠纤毛黏伏在腔面上, 必然导致前肠纤毛对食物以及晶杆体旋转的推动功能受阻。一方面间接说明A组胃摄食大量有毒铜绿微囊藻导致消化功能减退, 大量食物颗粒未经消化便流入前肠, 另一方面也说明缺氧导致贝类代谢减弱鳃丝纤毛摆动机能衰退, 使得食物颗粒以及黏液物质未能及时推进而堆积在前肠中。但第7天, B组前肠并未表现出明显的病变现象, 因此, 导致前肠功能受阻的以上两方面原因缺一不可。缺氧和有毒铜绿微囊藻还导致中肠腔面较大面积腔面纤毛出现脱落, 上皮细胞暴露出来, 甚至有部分上皮细胞破裂坏死, 具体原因有待进一步研究。第7天, A组直肠纤毛卷曲匍匐在腔面上, 其上附着少量未完全消

化的食物残渣还有少量黏液物质, 即说明贝类消化系统功能不全导致部分食物颗粒未能充分消化吸收, 也说明直肠肌收缩功能受阻未能及时将粪便排出体外; 第7天B组大量的粪便覆盖在纤毛上, 且纤毛相互黏连, 可能也与缺氧导致呼吸代谢功能减弱从而影响直肠肌收缩有关。

### 3.3 三角帆蚌的晶杆体

三角帆蚌的晶杆体为一根细长的几丁质的棒状物, 全长5~15 cm, 头部伸达胃腔, 与胃下部的片状物连接, 杆状的尾部伸入前肠腔内<sup>[30]</sup>。本实验中, 实验前各组三角帆蚌均存在晶杆体, 到第3天各处理组均有部分实验蚌晶杆体消失, 而且以铜绿微囊藻组A组和C组最显著, 小球藻组出现个别蚌晶杆体消失可能与蚌本身消化功能较弱有关, 而微囊藻组具有较高的晶杆体消失率, 一方面可能与微囊藻毒素导致贝类消化腺消化酶分泌机能受阻<sup>[31]</sup>有关, 另一方面则可能与微囊藻本身难以消化吸收有关。到第5天, A组和C组三角帆蚌晶杆体消失的现象更为显著, 仅C组能找到个别消融的晶杆体, 原因基本同上, 但还与A组缺氧导致基础代谢受阻有关<sup>[32]</sup>; 此时缺氧组B组晶杆体也出现显著的消失现象, 可能与缺氧条件下贝类代谢机能减退导致消化系统功能受阻<sup>[32]</sup>有关; 到第7天, A组和B组晶杆体存在比例为0, 值得注意的是, 此时C组晶杆体的存在比例出现显著上升, 对C组晶杆体扫描电镜观察发现, 晶杆体表面凹凸不平, 内部食物颗粒突出晶杆体, 杆部侧扁。在第14天, 将各处理组处理条件都调整为与D组相同时, 第15天, 原A组和B组的三角帆蚌又开始出现晶杆体, 到第21天又有部分蚌的晶杆体消失; 另外C组晶杆体存在比例没有上升反而出现了下降, 说明缺氧和有毒铜绿微囊藻已经对蚌消化系统造成不可恢复的损伤, 而且以双重胁迫组A组最为严重。

#### 参考文献:

- [1] 张根芳, 邓闽中, 方爱萍, 等. 蚌、鱼混养对几种水污染指标的影响[J]. 上海水产大学学报, 2005, 14(2): 156-161.  
Zhang G F, Deng M Z, Fang A P, *et al.* The effects of co-cultivation of pearl mussels and fishes on controlling water pollution[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2005, 14(2): 156-161(in Chinese).
- [2] 张绍浩, 邬红娟, 崔博, 等. 利用三角帆蚌控制水华的初步研究[J]. 水生生物学报, 2007, 31(5): 760-762.  
Zhang S H, WU H J, Cui B, *et al.* Preliminary study on control of algal blooms by *Hyriopsis cumingii* Lea[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2007, 31(5): 760-762(in Chinese).
- [3] 周小玉, 张根芳, 刘其根, 等. 鲢、鳙对三角帆蚌池塘藻类影响的围隔实验[J]. 水产学报, 2011, 35(5): 729-737.  
Zhou X Y, Zhang G F, Liu Q G, *et al.* Effects of *Hyriopsis cumingii* and *Aristichthys nobilis* on the enclosures phytoplankton community of *Hypophthalmichthys molitrix* pond[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(5): 729-737(in Chinese).
- [4] 徐海军. 淡水贝类作为水域环境的生态修复工具种的可行性研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2010: 1-65.  
Xu H J. A study on exploring feasibility of freshwater bivalves as ecological tools of restoring aquatic environment[D]. Suzhou: Soochow University, 2010: 1-65(in Chinese).
- [5] 金春华, 郑忠明, 陆开宏, 等. 铜绿微囊藻对三角帆蚌耗氧率和排氨率的影响[J]. 宁波大学学报(理工版), 2011, 24(1): 5-9.  
Jin C H, Zheng Z M, Lu K H, *et al.* Effects of *Microcystis aeruginosa* on oxygen consumption and ammonia excretion of freshwater mussel, *Hyriopsis cumingii*[J]. Journal of Ningbo University(NSEE), 2011, 24(1): 5-9(in Chinese).
- [6] Aguiar V M d C, Neto J A B, Rangel C M. Eutrophication and hypoxia in four streams discharging in Guanabara Bay, RJ, Brazil, a case study[J]. Marine Pollution Bulletin, 2011, 62(8): 1915-1919. DOI:10.1016/j.marpolbul.2011.04.035
- [7] 张硕, 董双林, 王芳. 中国对虾生物能量学研究I-温度、体重、盐度和摄食状态对耗氧率和排氨率的影响[J]. 青岛海洋大学学报, 1998, 28(2): 56-60.  
Zhang S, Dong S L, Wang F. Studies on the bioenergetics of *Penaeus chinensis* I. oxygen consumption and ammonia-N excretion rates under different conditions[J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 1998, 28(2): 56-60(in Chinese).
- [8] 骆大鹏, 余祥勇, 王梅芳, 等. 三角帆蚌鳃的组织学研究[J]. 广东海洋大学学报, 2008, 28(3): 6-11.



- Luo D P, Yu X Y, Wang M F, *et al.* Histological study on the inner and outer gill of *Hyriopsis cumingii*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2008, 28(3): 6-11(in Chinese).
- [9] 许人和, 和振武, 郝秋娜, 等. 背角无齿蚌的晶杆观察[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 1986(4): 85-89.
- Xu R H, He Z W, Hao Q N, *et al.* Observations on the crystalline style of *Anodonta woodiana*[J]. Journal of Henan Normal University, 1986(4): 85-89(in Chinese).
- [10] 王兰, 张小民, 赵赓, 等. 背角无齿蚌晶杆的扫描电镜观察[J]. 水生生物学报, 1996, 20(1): 63-65.
- Wang L, Zhang X M, Zhao G, *et al.* Observation on the crystalline style of a fresh water clam(*Anodonta woodiana*)with SEM[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1996, 20(1): 63-65(in Chinese).
- [11] 绳秀珍, 任素莲, 王德秀, 等. 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)晶杆的形态结构和组织化学研究[J]. 海洋学报, 2002, 24(1): 96-100.
- Sheng X Z, Ren S L, Wang D X, *et al.* A morphological, histological and histochemical study on the crystalline style of *Chlamys farreri*[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2002, 24(1): 96-100(in Chinese).
- [12] 孙虎山, 王晓安. 紫彩血蛤鳃的组织化学和扫描电镜研究[J]. 动物学杂志, 1999, 34(4): 9-12.
- Sun H S, Wang X A. Histochemical and electron scanning microscopic studies on the gills of *Nuttallia Olivacea*[J]. Chinese Journal of Zoology, 1999, 34(4): 9-12(in Chinese).
- [13] 邓道贵, 李瑞芝. 褶纹冠蚌鳃的组织学和扫描电镜观察[J]. 水产学报, 2002, 26(4): 301-306.
- Deng D G, Li R Z. Histological and scanning electron microscopic observations on the gill of *Cristaria plicata*[J]. Journal of Fisheries of China, 2002, 26(4): 301-306(in Chinese).
- [14] Gregory M A, George R C, Marshall D J, *et al.* The effects of mercury exposure on the surface morphology of gill filaments in *Perna viridis* (Mollusca, Bivalvia)[J]. Marine Pollution Bulletin, 1999, 39(1): 116-121. DOI:10.1016/S0025-326X(99)00119-8
- [15] Cheung S G, Shin P K S. Size effects of suspended particles on gill damage in green-lipped mussel *Perna viridis*[J]. Marine Pollution Bulletin, 2005, 51(8): 801-810. DOI:10.1016/j.marpolbul.2005.02.019
- [16] 崔龙波, 刘传林, 陆瑶华, 等. 大连湾牡蛎鳃的光镜和扫描电镜研究[J]. 水产学报, 1998, 22: 1-6.
- Cui L B, Liu C L, Lu Y H, *et al.* Studies on the gill of *Ostrea talienwhanensis* Crosse with optical and scanning electron microscopes[J]. Journal of Fisheries of China, 1998, 22:1-6(in Chinese).
- [17] 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. DOI:10.1016/S0041-0101(01)00105-2
- [18] Li S C, Wang W X, Hsieh D P H. Effects of toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* on the energy budgets and growth of two marine bivalves[J]. Marine Environmental Research, 2002, 53(2): 145-160. DOI:10.1016/S0141-1136(01)00117-9
- [19] Hu M, Wang Y, Tsang S T, *et al.* Effect of starvation on the energy budget of two Asian horseshoe crab species: *Tachypleus tridentatus* and *Carcinoscorpius rotundicauda* (Chelicerata, Xiphosura)[J]. Marine Biology, 2011, 158(7): 1591-1600. DOI:10.1007/s00227-011-1672-0
- [20] 张根芳, 王旦旦, 方爱萍, 等. 三角帆蚌怀卵期外侧瓣鳃结构初步研究[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(4): 419-423.
- Zhang G F, Wang D D, Fang A P, *et al.* Preliminary study on outside lamina structure of *Hyriopsis cumingii* during egg-bearing period[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2006, 15(4): 419-423(in Chinese).
- [21] 肖永清, 石安静. 硫酸铜对三角帆蚌肝脏和鳃的毒害[J]. 水产学报, 1999, 23(3): 308-312.
- Xiao Y Q, Shi A J. Toxicity of copper sulfate to liver and gill of *Hyriopsis cumingii*[J]. Journal of Fisheries of China, 1999, 23(3): 308-312(in Chinese).
- [22] 刘巧林, 许宝红, 钟蕾, 等. 三角帆蚌瘟病组织病理学动态变化[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2009, 35(4): 406-411.
- Liu Q L, Xu B H, Zhong L, *et al.* Histopathological on dynamic characteristics of *Hyriopsis cumingii* plague[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2009, 35(4): 406-411(in Chinese).
- [23] 费志良, 吴军, 赵钦, 等. 三角帆蚌对藻类滤食及消化的研究[J]. 淡水渔业, 2006, 36(5): 24-27.
- Fei Z L, Wu J, Zhao Q, *et al.* Effect of filtration and digestion of *Hyriopsis cumingii* to algae[J]. Freshwater Fisheries, 2006, 36(5): 24-27(in Chinese).

- [24] 闻海波, 徐钢春, 华丹. 圆背角无齿蚌幼蚌在特定条件下的选择滤食与生长的初步研究[J]. 上海水产大学学报, 2006, 14(4): 464-467.  
Wen H B , Xu G C , Hua D. Preliminary study on the selective feeding and growth of *Anodonta woodiana pacifica* juveniles under the particular conditions[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2006, 14(4): 464-467(in Chinese).
- [25] Beck K, Neves R J. An evaluation of selective feeding by three age-groups of the rainbow mussel *Villosairis*[J]. North American Journal of Aquaculture, 2003, 65(3): 203-209. DOI:10.1577/C02-031
- [26] Shumway S E. A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 1990, 21(2): 65-104. DOI: 10.1111/j.1749-7345.1990.tb00529.x
- [27] Dabruzzi T F, Bennett W A. Hypoxia effects on gill surface area and blood oxygen-carrying capacity of the Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2014, 40(4): 1011-1020. DOI: 10.1007/s10695-013-9901-8
- [28] 欧阳珊, 吴小平, 邓宗觉, 等. 三角帆蚌消化系统扫描电镜观察[J]. 水产学报, 1995, 19(2): 187-189.  
Ouyang S, Wu X P, Deng Z J, et al. SEM observation on the digestive system of *Hyriopsis cumingii*[J]. Journal of Fisheries of China, 1995, 19(2): 187-189(in Chinese).
- [29] 李玉和, 郭淑华. 乌鳢消化道粘膜上皮的扫描电镜研究[J]. 解剖学报, 1992, 23(1): 98-101.  
Li Y H, Guo S H. SEM study on the mucosa of digestive tract of *Ophicephalus argus* Cantor[J]. Acta Anatomica Sinica, 1992, 23(1): 98-101(in Chinese).
- [30] 徐钢春, 华丹, 顾若波, 等. 三角帆蚌消化酶的分布特性和晶杆的形态结构[J]. 水产学报, 2008, 32(2): 296-302.  
Xu G C, Hua D , Gu R B , et al. Distribution properties of digestive enzyme of *Hyriopsis cumingii* and morphological configuration of crystalline style[J]. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(2): 296-302(in Chinese).
- [31] 袁明哲, 陈姗, 陈嘉伟, 等. 有毒铜绿微囊藻胁迫下三角帆蚌消化系统的扫描电镜观察[J]. 生物学杂志, 2015, 32(1): 22-25.  
Yuan M Z, Chen S, Chen J W, et al. Scanning electron microscopy observation of *Hyriopsis cumingii* digestive system under toxic *Microcystis aeruginosa* exposure[J]. Journal of Biology, 2015, 32(1): 22-25(in Chinese).
- [32] 周作强, 丁晴晴, 刘其根, 等. 缺氧对贝类的胁迫效应及其对其免疫系统的影响[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(3):324-330.  
Zhou Z Q, Ding Q Q, Liu Q G, et al. Stresses of hypoxia and its effects on immune system of bivalve[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2013, 8(3): 324-330(in Chinese).

## Scanning electron microscopic observations of gill, digestive organ and crystal rod of *Hyriopsis cumingii* exposed to hypoxia and toxic *Microcystis aeruginosa*

GU Yedan, SHANG Yueyong, YUAN Mingzhe, CHEN Xueying,  
ZHOU Zuoqiang, HU Menghong\*

(College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** In order to clarify the toxic effects of hypoxia and toxic *Microcystis aeruginosa* on freshwater pearl mussel (*Hyriopsis cumingii*) and histopathology, scanning electron microscopy was used to investigate the histopathological changes in the gill, stomach, intestine and crystal rod of the freshwater pearl mussel. The results showed that a large number of gill shedding and columnar cell necrosis were observed from the seventh day in the combined experimental group with hypoxia and toxic algae, as well as cilia loss from gastrointestinal cavity surface and epithelial cell necrosis rupture, and the crystal rod completely disappeared from the fifth day; from the seventh day, in hypoxia group and toxic algae group, a small amount of gill and digestive tract lesions were observed, and in hypoxia group, crystal rod completely disappeared from the seventh day, while in toxic algae group, the crystal rod persists throughout the experiment. After the stress was removed, in the three exposed groups, the crystal rods did not return to the normal levels as in the control group. Therefore, hypoxia and toxic *Microcystis aeruginosa* caused unrecoverable damages in gill and digestive system of *H. cumingii*, and the combined stress group was most severely affected, and hypoxia caused more severe effects than the toxic *Microcystis aeruginosa*. This study provides a histopathological reference for the physiological adaptation mechanisms in *H. cumingii* exposed to hypoxia and toxic algae, and a theoretical basis for the feasibility of *H. cumingii* as a bioremediation tool species for improving eutrophic waters.

**Key words:** *Hyriopsis cumingii*; toxic *Microcystis aeruginosa*; crystalline style; gill structure; hypoxia; scanning electron microscopy

**Corresponding author:** HU Menghong. E-mail: mhhu@shou.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31202015); Shanghai University Knowledge Service Platform Project (ZF1206)