

微囊藻毒素在铜锈环棱螺肝组织中的累积 降解及 对 3 种酶活性的影响

张双玲, 陆开宏, 郑忠明, 潘洁慧, 朱津永

(宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要:把铜锈环棱螺(*Bellamya aeruginosa*)暴露于不同浓度的有毒微囊藻藻液中(对照组:只投喂四尾栅藻(*Scenedesmus quadricauda*);混合藻组:50%四尾栅藻+50%铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*);蓝藻组:只投喂铜绿微囊藻),用酶联免疫检测法(Enzyme-linked immuno sorbent assay,ELISA)检测藻液和肝组织中藻毒素浓度,藻液中包括藻相和水相的总微囊藻毒素(MC)浓度分别为:对照组 $0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$;混合藻组(14.47 ± 1.22) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$;蓝藻组(29.47 ± 2.43) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。螺在两种不同毒素浓度藻液中暴露 15 d 后再移入四尾栅藻藻液中降解 15 d。结果表明,暴露期间,混合藻组、蓝藻组螺肝组织中 MC 含量均为先增加后减少,再增加,且同期混合藻组 MC 含量都明显高于蓝藻组;作为机体代谢生物标志物的酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(ALP)活性随 MC 浓度及其暴露时间发生相应变化;作为解毒生物标志物的谷胱甘肽硫转移酶(GST)活性在混合藻组先被诱导后被抑制,在蓝藻组初期变化不明显后表现为诱导。在 15 d 降解过程中,混合藻组和蓝藻组 MC 含量均持续下降;机体生物标志物 ACP、ALP 和 GST 活性表现为不同程度的降低。本试验结果为 ACP、ALP 和 GST 活性作为 MC 胁迫的生物标志物提供了一些依据。

关键词:微囊藻毒素(MC);生物标志物;酸性磷酸酶(ACP);碱性磷酸酶(ALP);谷胱甘肽硫转移酶(GST);铜锈环棱螺(*Bellamya aeruginosa*)

中图分类号:X503.225 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2009)01-0054-06

Accumulation and Degradation of Microcystins and Their Effects on Activities of Three Kinds of Enzymes in Liver of *Bellamya Aeruginosa*

ZHANG Shuang-ling, LU Kai-hong, ZHENG Zhong-ming, PAN Jie-hui, ZHU jin-yong

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: A species of freshwater snail (*Bellamya aeruginosa*) was exposed to different concentrations of microcystins (MC) with the control group fed only by *Scenedesmus quadricauda*, the mixed group fed by 50% *S. quadricauda* + 50% *Microcystis aeruginosa*, and the blue-algae group fed by only *M. aeruginosa*. Concentration of MC in the culture solution and the hepatic tissue of the snails was measured using the Enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA). The average concentration of MC in the control, the mixed and the blue-algal group was 0, (14.47 ± 1.22) and (29.47 ± 2.43) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. After 15-day's exposure, *B. aeruginosa* was transferred to *S. quadricauda* culture for MC degradation with a 15-day duration. The MC content in the liver of *B. aeruginosa* in both experimental groups (the mixed and the blue-algal group) all increased initially, then decreased, and increased again during the exposure period. The content of MC was significantly higher in the mixed group than that in the blue-algal group. The activities of acid phosphatases (ACP) and alkaline phosphatases (ALP) as biomarker enzymes changed in a time-dependent manner in response to MC concentration in the liver of *B. aeruginosa*. The activity of glutathione-S-transferase (GST) as a biomarker enzyme of detoxification was induced initially and then inhibited in the mixed group during the exposure period. Initial activity of GST in the blue-algal group did not change significantly, but increased remarkably at the late stage of the exposure. A gradual yet incomplete elimination of MC content was observed during the degradation period. And these enzymatic activities all decreased during the course of degradation. These changes were very prominent in the livers. The changes in ACP, ALP and GST activities in the experiment sug-

收稿日期:2008-04-12

基金项目:国家自然科学基金(30771658);浙江省自然科学基金(Z505319);宁波市自然科学基金(2006A610081);浙江省教育厅项目(20061641)

作者简介:张双玲(1975—),女,山东高唐人,硕士研究生,研究方向为水域生态。E-mail:zhshling69@126.com

通讯作者:陆开宏 E-mail:lukaihong@nbu.edu.cn

gest that these enzymes were actively involved in the detoxification process in *B. aeruginosa* tissue contaminated with MC. The results of this experiment demonstrated that the activities of ACP、ALP and GST may be used as stress biomarkers of *B. aeruginosa* and other aquatic invertebrates contaminated by MC.

Keywords: microcystins (MC); biomarker; acid phosphatases (ACP); alkaline phosphatases (ALP); glutathione-S-transferase (GST); *Bellamyia aeruginosa*

微囊藻毒素(Microcystin, MC)是蓝藻水华产生的一种次级代谢物,是一组环状七肽类物质^[1],具有很强的细胞毒性^[2-3],主要由淡水藻类铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)产生^[4]。目前已发现有 70 多种同分异构体^[5],但存在最普遍、研究最广泛的是 MC-LR、RR、YR 和 LA。含有 MC 的水华能引起野生动物、鱼类、家畜、家禽及宠物中毒和死亡,中毒死亡的主要原因是肝损伤,MC 通常造成肝内出血甚至肝坏死^[6-7]。MC 也危害人类健康,如果经常暴露于含有毒素的水体,会引发人患肝炎及肝癌^[8-9]。有研究证明,饮用含有 MC 水的人群肝癌发病率明显高于饮用深井水者^[10]。由于 MC 专一性地作用于肝脏,是极强的促肿瘤剂,对人类健康的危害正日益受到全世界关注。

铜锈环棱螺(*Bellamyia aeruginosa*)广泛分布于我国的湖泊、河流、沟渠和池塘中,是淡水中的重要螺类,可作为家禽的饲料和肉食性鱼类的天然饵料。不管是沿海还是内陆居民都有食用环棱螺的习惯。铜锈环棱螺有摄食藻类和有机颗粒的习性,在食物链中起着重要的传递作用。因此研究 MC 暴露对螺的毒理效应显得意义重大。

探索能反映低浓度污染物对生物早期影响的参数,是水生态毒理学研究的重要内容。酶可以作为指示性标记来反映污染物的影响^[11]。酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(ALP)参与动物机体的各种代谢过程,如分子渗透性、发育和细胞分化,也是动物体内重要的解毒体系。因此,它们可以作为被污染物污染致毒的生物指示剂^[12]。ACP、ALP 活性作为细胞中溶酶体标记酶能被外源性化学物改变^[13-14],但利用这两种酶活性研究 MC 对水生生物毒性效应的报道还很少^[15]。谷胱甘肽硫转移酶(GST)是解毒系统第二阶段的解毒酶,对污染物敏感,其活性的高低能很好地表示污染程度,而且活性较稳定,此外又是生物体肝组织损伤的敏感指标。关于纯 MC、含 MC 蓝藻、或 MC 粗提物对无脊椎动物^[16-18]和鱼^[19-22]组织 GST 活性影响的研究较多。贝类方面,Fitzpatrick 等^[23]对紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)的研究提示 GST 活性可以

用来作为机体的潜在生物标志物,但把 ACP、ALP 和 GST 活性用于 MC 对铜锈环棱螺毒性效应的研究尚未见报道。

本试验在室内模拟自然环境条件,研究 MC 在铜锈环棱螺肝组织内的积累、降解及其积累、降解过程中对 3 种生物标志物酶指标(ACP、ALP 和 GST)的影响变化,以期探明这 3 种酶作为 MC 胁迫生物标志物的可行性,同时为深入揭示藻毒素的生态毒理效应及其生态风险评价提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

铜绿微囊藻和四尾栅藻(*Scenedesmus quadricauda*)藻种由宁波大学水域生态与环境实验室提供,铜绿微囊藻采用 BG11 培养基^[24]于锥形瓶内培养。温度(25±1)℃,光照 36 μE·m⁻²·s⁻¹,光暗比 12 h:12 h。四尾栅藻采用“浙水院 3 号”培养基^[25]通气培养。室温,自然光照。

试验所用铜锈环棱螺采自宁波市江北区姚江流域。螺类采回后,清除其体表附着生物及污物,放于实验室水族缸中以曝气过的自来水暂养,每日换水并且以磨碎的白菜叶喂食,死亡的螺及时挑出。

1.2 毒素暴露和取样

试验前将螺饥饿 2 d,挑选活力好的螺放于培养箱中 24 h 适应实验条件。24 h 后再将活力差的螺挑出。试验分 3 组:(1)单独投喂四尾栅藻(以下简称对照组);(2)投喂 50%铜绿微囊藻+50%四尾栅藻的混合藻液(以下简称混合藻组);(3)单独投喂铜绿微囊藻(以下简称蓝藻组)。毒素暴露时,先用血球计数板法大约计数培养好的原藻液浓度,再根据螺的数目、所需藻液的浓度和体积计算所需要的藻液体积,用经脱脂棉过滤和煮沸处理后的自来水配好实验所需藻液,再用血球计数板法计数,以求精确。试验藻类的总浓度恒定,为 1×10⁶ cell·mL⁻¹。

1.2.1 积累试验

每组设 3 个重复,共 9 只试验缸。每个玻璃缸(20

cm×10 cm×20 cm)里放洗净后的螺40个,初始时,每个缸放4 L试验藻液,保持每只螺负荷100 mL藻液的密度。试验进行至第0、5、10、15 d时,每个缸取4只螺,分别检测肝脏中的藻毒素含量和ACP、ALP和GST活性。试验期间,随着试验螺数量的减少,藻液也相应减少。将所有的试验缸放于光照培养箱中。温度(25±1)℃,光照36 μE·m⁻²·s⁻¹,光暗比12 h:12 h。试验期间每日更换藻液,及时剔除死亡的螺体。

1.2.2 降解试验

积累试验结束后,将2组有毒藻液中的螺取出洗净,分别移至密度为1×10⁶ cells·mL⁻¹的四尾栅藻藻液(经检测不含MC)中。其余同1.2.1。

1.3 肝组织毒素和酶活测定

1.3.1 毒素测定

采用美国Beacon公司生产的MC检测试剂盒对试验所用的微囊藻、栅藻悬浮液和环棱螺肝组织进行ELISA法检测。螺肝组织样品的处理参照张维昊等^[26]的方法。

取试验用藻液1 mL,冻融3次后于10 000 r·min⁻¹下离心10 min,取上清液用ELISA法分析藻液的藻毒素浓度(包括藻相和水相中的毒素)。

1.3.2 酶活测定

取螺的肝脏,用冷生理盐水洗去污渍后,再用滤纸吸干表面水分,称质量,冰浴条件下用超声波细胞粉碎机(JY96-II型)粉碎1 min,匀浆液在冷冻离心机(SORVALL Primo R型)(3 000 r·min⁻¹, 4℃, 10 min)离心后,小心吸取澄清的上清液置于4℃保存(所有样品在48 h内测完),若仍有浑浊可重复离心。酶活性测定和蛋白含量测定(考马斯亮蓝法)采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒完成,详细操作按使用说明。

根据试剂盒测定原理,ACP活性定义为:每克组织蛋白,在37℃与基质作用30 min产生1 mg 酚为1个活力单位(U·gprot⁻¹);ALP活性定义为:每克组织蛋白在37℃与基质作用15 min产生1 mg 酚为1个活力单位(U·gprot⁻¹);GST的活性定义为:每毫克组织蛋白,在37℃反应1 min扣除非酶促反应,使反应体系中GSH浓度降低1 μmol·L⁻¹为一个酶活力单位。

2 结果

2.1 螺肝组织对微囊藻毒素的积累与降解

积累试验期间,混合藻组藻液水相和藻相的总

MC浓度平均为(14.47±1.22) μg·L⁻¹;蓝藻组为(29.47±2.43) μg·L⁻¹;对照组藻液(即绿藻组,下同)没有检测到藻毒素。从图1可见,整个积累试验期间混合藻组肝组织中MC含量都明显高于蓝藻组(P<0.05),两组MC含量变化趋势均为先增加后减少,再增加。

降解试验中,螺肝组织中MC含量在混合藻组和蓝藻组均持续下降,降解第10 d后,下降速度趋缓。期间,仅以绿藻(四尾栅藻)为食的对照组螺肝组织中没有检测到藻毒素。

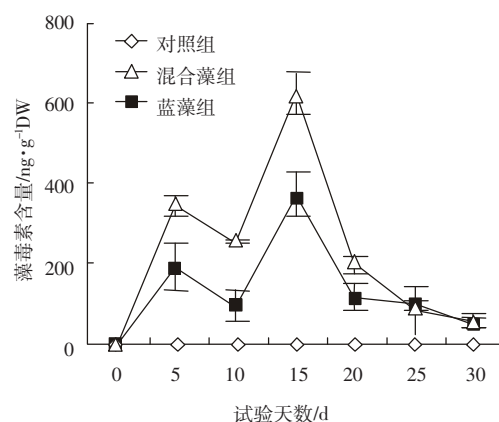


图1 MC在螺肝组织内的积累(前15 d)和降解(后15 d)

Figure 1 Accumulation and degradation of MC in liver of *B. aeruginosa*

2.2 ACP活性对螺肝组织毒素积累与降解的响应

图2所示,整个积累与降解过程中,螺肝组织ACP活性变化趋势和藻毒素含量的变化趋势基本上是一致的。积累期间,混合藻组和蓝藻组的ACP活性均显著高于对照组(P<0.05),混合藻组ACP活性于第5 d达最大值(528.9±15.06) U·gprot⁻¹,之后,酶活持

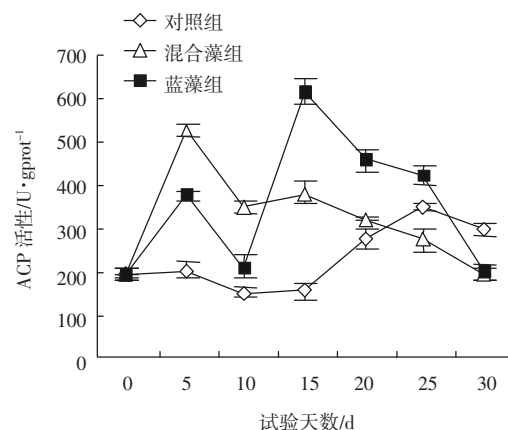


图2 MC积累与降解过程中螺肝组织ACP活性变化

Figure 2 Effect of MC on acid phosphatase (ACP) activity in liver of *B. aeruginosa*

续下降;蓝藻组 ACP 活性在第 5 d 升至 (376.3 ± 11.57) $\text{U}\cdot\text{gprot}^{-1}$,第 10 d 时随藻毒素下降有所回落,第 15 d 时,又上升至最大值 (616.4 ± 29.37) $\text{U}\cdot\text{gprot}^{-1}$,是混合藻组的 1.5 倍。

把试验螺移入无毒栅藻藻液中后,混合藻组和蓝藻组的 ACP 活性均呈下降趋势,降解至第 15 d,两处理组的酶活性都接近于初始值,且与对照组无显著差异($P>0.05$)。

2.3 ALP 活性对毒素积累与降解的响应

图 3 可见,与 ACP 活性变化类似,混合藻组和蓝藻组 ALP 活性的变化也与肝组织藻毒素含量的变化一致。积累期间,两处理组的 ALP 活性均先升后降,至第 15 d 达到各自的最高值。

降解试验的前 5 d,两处理组 ALP 活性下降明显,5 d 后下降速度趋缓,并与对照组趋于一致。

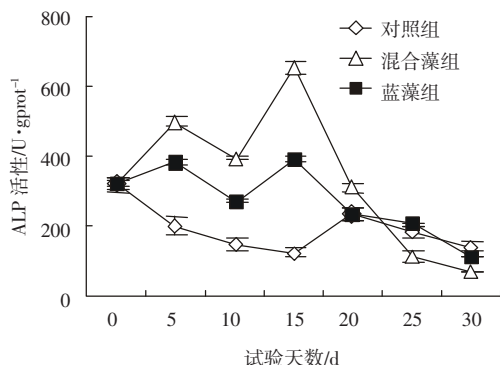


图 3 MC 积累与降解过程中螺肝组织 ALP 活性变化
Figure 3 Effect of MC on alkaline phosphatase (ALP) activity in liver of *B. aeruginosa*

2.4 GST 活性对毒素积累与降解的响应

如图 4,把螺放入微囊藻藻液中后,混合藻组 GST 活性在前 10 d 显著增加($P<0.05$),到第 10 d 时达最高值 (135.37 ± 16.14) $\text{U}\cdot\text{mgprot}^{-1}$,之后开始下降,到第 15 d 时降到积累期的最低值 (44.1 ± 10.83) $\text{U}\cdot\text{mgprot}^{-1}$,和对照组趋向一致;相反,蓝藻组 GST 活性在积累试验的前 10 d 与对照组相比无显著差异($P>0.05$),且变化一致;第 10 d 后,GST 活性迅速回升。

降解实验开始后,两处理组的 GST 活性与对照组变化趋势一致,均表现为先升后降,至实验结束时,处理组和对照组的酶活值无明显差异($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 藻毒素积累与降解

积累试验开始后,MC 在两处理组铜锈环棱螺肝

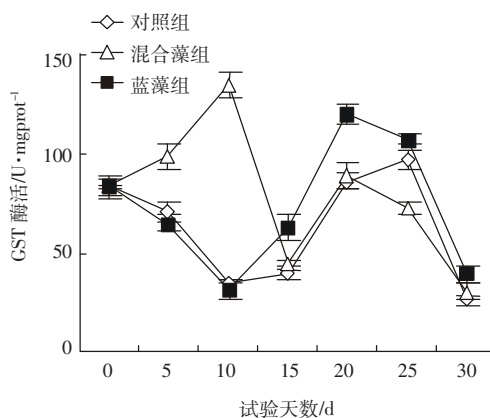


图 4 MC 积累降解过程中螺肝组织 GST 活性变化
Figure 4 Effect of MC on glutathione-S-transferase (GST) activity in liver of *B. aeruginosa*

组织内就迅速积累,但相对而言,混合藻组螺肝组织内 MC 的积累速率快,且整个积累试验期间混合藻组螺肝组织中 MC 的含量都明显高于蓝藻组,说明低浓度的 MC 暴露比高浓度的暴露在螺肝组织中更易积累;同时螺肝组织中 MC 的积累量也并非持续上升。结合国内外资料^[27-29],笔者认为,高浓度的 MC 暴露之所以没有导致螺肝组织中高浓度的 MC 积累,可能因为高浓度的 MC 使螺本身出现某种抵御机制所致。事实上,长期暴露于高浓度下的螺类,多数时间紧闭足厣,摄食量也明显比低 MC 浓度的混合藻组螺类少,一定程度上减少了摄食和滤水这两条暴露途径的毒素积累。

与之相对应,将试验螺移入无毒的栅藻悬浮液后,两处理组螺肝组织的 MC 含量迅速下降,且低毒暴露的混合藻组螺类 MC 的下降速度要比蓝藻组快得多,这可能是因为混合藻组藻液中 MC 浓度相对较低,对螺正常生理功能影响较小所致。当环境中藻毒素负荷消除后,螺能迅速地将这种外源毒素降解或者排泄出体外。而蓝藻组中的螺类经较高浓度 MC 暴露后螺体活力严重下降,导致其对 MC 的降解效率不及混合藻组。这也可从本试验两处理组螺肝组织中 3 种酶的活性变化得以体现。

本试验中,两个处理组螺肝组织中 ACP 活性先被诱导后被抑制,而后再被诱导,与肝组织中毒素含量的变化趋势基本一致,但不同处理组在不同的时间段表现出不同的程度。在第 5 d 肝组织中 MC 积累较少时,积累值相对较高的混合藻组螺类表现出较高的 ACP 活性;而在第 15 d 肝组织中 MC 积累较多时,积累值相对较低的蓝藻组螺类表现出更高的 ACP 活

性,说明过高或过低浓度 MC 都不易诱导 ACP 活性。降解过程中,由于 MC 含量持续下降,两个处理组的 ACP 活性均快速回落,降解试验结束时已恢复到初始值。Hilsenhoﬀ^[30]指出:ACP 活性随着污染物浓度升高而呈上升趋势,但是其活性在浓度较高的污染物暴露中不太稳定,会随着时间的改变而变化。本试验证明了这一点。鱼肝脏、肌肉和明虾肝胰腺试验中^[31-32],由于环境中的 MC 与溶酶体结合,从而促使 ACP 活性增加。Pichardo^[33]对鱼的体外细胞株(RTG-2 and PHLC-1)进行的 MC 毒性试验认为:溶酶体机能和 MC-LR 暴露存在浓度-效应关系,同时也指出,浓度-效应关系可能与细胞骨架修复和 MC-LR 诱导的氧化应激^[34-36]有关。本试验说明,螺肝组织中 ACP 活性对 MC 的变化有积极的响应,ACP 活性随毒素浓度及其作用时间的变化发生相应变化,可以作为 MC 胁迫的生物标志物。

积累试验中,ALP 活性与 ACP 活性、MC 含量变化大体一致,即先被诱导后被抑制,再被诱导。毒素降解过程中,两处理组中 ALP 活性均降低,但降解速率随时间不同而不同。Molina 等^[19]在罗非鱼暴露于不同形式 MC 的试验中指出,ACP、ALP 活性在肝、肾中均被诱导,酶活显著增加(ALP 仅在 MC 暴露 21 d 时),且与 MC 暴露有时间-效应关系。本试验也证实了这一点。ALP 活性会随毒素浓度不同和毒素作用时间的不同产生不同响应,ALP 活性也能很好地用来监测 MC 胁迫的生物标志物。

一些室内试验数据显示,双壳类软体动物对蓝藻毒素有一定的抵抗力,这可能是因为机体为了保护自身免受毒素的伤害而产生的一种自我保护解毒机制。经由可溶性 GST、MC 和 GSH 结合,从而促使有机体解毒的过程在很多生物体中已有报道,如贻贝和其他水生生物^[37]。Fitzpatrick^[23]提议把 GST 活性作为软体动物潜在的有机污染的生物标志物。但不同实验所得出的结果不太一致。Cazenave^[38]指出,暴露于 MC 的胡椒甲鲶(*Corydoras paleatus*),其肝脏中 GST 活性被抑制。本试验积累试验前期,混合藻组 GST 活性随毒素积累而增加,蓝藻组随毒素积累而无显著变化,说明螺肝组织中低 MC 含量对 GST 活性无显著影响(或者有影响但被自身的某种保护机制消除),而较高的 MC 含量对 GST 活性有一定的诱导作用;积累后期,两个处理组的 GST 活性又表现出相反的变化趋势。这说明 MC 含量在体内积累到一定程度时,会促使 GST 活性增加;但在较长时间的作用下,GST 的解毒

能力会降低,表现为对酶活性的抑制。由此看出,不同浓度和不同作用时间 MC 对螺肝组织 GST 活性的影响模式是不完全一样的,这与 Pietsch 等^[16]的试验结果一致。Pietsch 等证实了 MC 对 GST 活性的诱导,认为 GST 活性增加可能是因为 MC 与 GSH 结合率的增加或机体本身解毒机制的增强,同时也指出在高浓度组,GST 活性在后期表现为下降,表明过量的藻毒素处理破坏了 GST 的解毒作用机制。从上述结果我们可以这样认为,GST 活性受到诱导说明有胁迫,而 GST 活性抑制则似乎受到较严重或较长时间的胁迫。因此,我们认为,前人的有关报道所以出现 GST 活性无影响、诱导或抑制等多种情形,除了试验种类不同之外,可能与胁迫物种类、浓度及暴露时间有关。

参考文献:

- [1] Carmichael W W. The toxins of cyanobacteria[J]. *Sci Am*, 1994(270): 64-72.
- [2] Codd G A, Ward C J, Bell S G. Cyanobacterial toxins: Occurrence, modes of action, health effects and exposure routes[J]. *Applied Toxicology*, 1997(19): 399-410.
- [3] Figereido De, Azeiteiro D R, Esteves U M, et al. Microcystin-producing blooms—a serious global public health issue[J]. *Ecotox Environ Saf*, 2004(59): 151-163.
- [4] 徐立红,张雨元. 微囊藻毒素分子致毒机理研究进展[J]. *水生生物学报*, 1993, 17(4): 365-374.
XU L H, ZHANG Y Y. Recent developments in the study of the molecular intoxication mechanism of microcystins[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1993, 17(4): 365-374.
- [5] Fastner J, Codd G A, Metcalf J S, et al. An international intercomparison exercise for the determination of purified microcystin-LR and microcystins in cyanobacterial field material[J]. *Anal Biochem Chem*, 2002(374): 437-444.
- [6] Hallegraff G M. A review of harmful algal bloom and their apparent global increase[J]. *Phycologia*, 1993, 32(2): 79.
- [7] Dawson R M. The toxicology of microcystins[J]. *Toxicon*, 1998, 6(7): 953-962.
- [8] Codd G A, Bell S G, Kny K, et al. Cyanobacterial toxin exposure routes and human health[J]. *Eur J Phicol*, 1999(34): 405.
- [9] Falconer I R, Beresford A, Runnær M T C. Evidence of liver damage in a human population exposed to toxin from a bloom of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* in a drinking water supply reservoirs[J]. *Med J Aust*, 1983(1): 511.
- [10] Yu S Z. Drinking water and primary liver cancer[M]. Beijing: Academic Press, 1989.
- [11] 徐立红,张雨元,陈宜瑜. 分子生态毒理学研究进展及其在水环境保护中的意义[J]. *水生生物学报*, 1995, 19(2): 171-185.
XU Li-hong, ZHANG Yong-yuan, CHEN Yi-yu. The advances of molecular ecotoxicology and its significance in water environment pro-

- tection[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1995, 19(2): 171–185.
- [12] Mazorra M T, Rubio J A, Blasco J. Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Scrobicularia plana*: Kinetic characteristics and effects of heavy metals[J]. *Comp Biochem Physiol B*, 2002(131): 241–249.
- [13] Cajaraville M P, Bebianno M J, Blasco J, et al. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: A practical approach[J]. *Sci Total Environ*, 2000(247):295–311.
- [14] Karuppasamy R. Effect of phenyl mercuric acetate(PMA) on acid and alkaline phosphatase activities in the selected tissue of fish[J]. *Environ Ecol*, 2000(18): 643–650.
- [15] Molina R, Moreno I, Pichardo S, et al. Acid and alkaline phosphatase activities and pathological changes induced in Tilapia fish (*Oreochromis sp.*) exposed subchronically to microcystins from toxic cyanobacterial blooms under laboratory conditions[J]. *Toxicon*, 2005(46): 725–735.
- [16] Pietsch C, Wiegand C, Ame M V, et al. The effects of a cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: Evidence for cyanobacterial toxin modulating factors[J]. *Environ Toxicol*, 2001, 16(6):535–542.
- [17] Chen W, Song L R, Ou D Y, et al. Chronic toxicity and responses of several important enzymes in *Daphnia magna* on exposure to sublethal microcystin-LR[J]. *Environ Toxicol*, 2005, 20(3):323–330.
- [18] Rosa C E, da Souza M S, de Yunes J S, et al. Cyanobacterial blooms in estuarine ecosystems: Characteristics and effects on *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) [J]. *Mar Pollut Bull*, 2005, 50(9):956–964.
- [19] Malbrouck C, Kestemont P. Effects of microcystins on fish[J]. *Environ Toxicol Chem*, 2006(25):72–86.
- [20] Fu J, Xie P. The acute effects of microcystin-LR on the transcription of nine glutathione S-transferase genes in common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Aquat Toxicol*, 2005, 80(3): 261–266.
- [21] Li X Y, Liu Y D, Song L R, et al. Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR[J]. *Toxicon*, 2003(42):85–89.
- [22] Li X Y, Chung I K, Kim J I, et al. Oral exposure to *Microcystis* increases activity-augmented antioxidant enzymes in the liver of loach (*Misgurnus mizolepis*) and has no effect on lipid peroxidation[J]. *Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol*, 2005, 141(3):292–296.
- [23] Fitzpatrick P J, O Halloran J, Sheehan D, et al. Assessment of a glutathione S-transferase and related proteins in the gill and digestive gland of *Mytilus edulis*(L.), as potential organic pollution biomarkers [J]. *Biomarkers*, 1997(2): 51–56.
- [24] 郑朔方, 杨苏文, 金相灿. 铜绿微囊藻生长的营养动力学[J]. 环境科学, 2005, 26(2): 152–156.
ZHENG Shuo-fang, YANG Su-wen, JIN Xiang-can. Dynamic Studies on the Effect of Nutrients on the Growth of *Microcystis aeruginosa*[J]. *Environmental Science*, 2005, 26(2): 152–156.
- [25] 成永旭. 生物饵料培养学[M]. (第二版)北京: 中国农业出版社, 2005: 75.
CHENG Yong-xu. Live food cultivatology[M]. Beijing: Chinese Agri-culture Press, 2005: 75.
- [26] 张维昊, 金丽娜, 徐小青. 鱼肉中微囊藻毒素的高效液相色谱法分析[J]. 分析科学学报, 2001, 17(2):117–119.
ZHANG Wei-hao, JIN Li-na, XU Xiao-qing. Determination of microcystins in fish by high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Analytical Science*, 2001, 17(2):117–119.
- [27] 李效宇, 刘永定, 张榜军. 微囊藻毒素对澳洲水泡螺的毒性效应[J]. 河南师范大学学报, 2005, 33(4): 106–109.
LI Xiao-yu, LIU Yong-ding, ZHANG Bang-jun. Toxic effects of microcystin on snail (*Bulinus australianus*) [J]. *Journal Henan Normal University (Natural Science)*, 2005, 33(4): 106–109.
- [28] Williams D E, Dawe S C, Kent M L, et al. Bioaccumulation and clearance of microcystins from salt water mussels, *Mytilus edulis*, and in vivo evidence for covalently bound microcystins in mussel tissues [J]. *Toxicon*, 1997, 35: 1617–1625.
- [29] Ozawa K, Yokoyama A, Ishikawa K, et al. Accumulation and depuration of microcystins produced by the cyanobacterium *Microcystis* in a freshwater snail[J]. *Limnol*, 2003(4): 131–138.
- [30] Hilsenhoff W L. Rapid field assessment of organic pollution with a family-level biotic index[J]. *J North Am Benthol Soc*, 1988(73): 65–68.
- [31] Ghorpade N, Mehta V, Khare M, et al. Toxicity study of diethyl phthalate on freshwater fish *Cirrhina mrigala* [J]. *Ecotox Environ Saf*, 2002 (53): 255–258.
- [32] Bhavan P S, Geraldine P. Profiles of acid and alkaline phosphatases in the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to endosulfan[J]. *Environ Biol*, 2004(25): 213–219.
- [33] Pichardo S, Jos A, Zurita J L, et al. The use of the fish cell lines RTG-2 and PLHC-1 to compare the toxic effects produced by microcystins LR and RR[J]. *Toxicol in Vitro*, 2005, 19(7): 865–873.
- [34] Ding W, Ong C. Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, 220: 1–7.
- [35] Bouauücha N, Maatouk I. Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes[J]. *Toxicol Lett*, 2004, 148 (1–2): 53–63.
- [36] Moreno I, Pichardo S, Jos A, et al. Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally[J]. *Toxicon*, 2005, 45 (4): 395–402.
- [37] Pflugmacher S, Wiegand C, Oberemm A L, et al. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: The first step of detoxication[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1425: 527–533.
- [38] Cazenave J, Bistoni M A, Pesce S F, et al. Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR[J]. *Aquat Toxicol*, 2006, 76 (1): 1–12.