

纳米硒对尼罗罗非鱼生长的影响

●邓岳松* 陈权军

硒是鱼类必需的微量元素,其主要生理功能为抗氧化作用。硒是含硒蛋白的一个组份,有维持酶蛋白催化功能的作用。它可作为甲状腺素合成的抗氧化剂和催化剂;为免疫系统发挥正常功能所必需;可对抗病毒繁殖、为精子活动所必需;可以降低流产的危险性;硒缺乏可导致免疫能力下降,硒可抑制氧化和炎症反应,鱼类缺硒会导致贫血、肌肉营养不良甚至死亡(Poston et al, 1976; Cowey et al, 1989; Bell et al, 1986)。寻找能灵敏提高生物体免疫功效的硒形式,对其发挥生物功效同时减少硒毒性很有意义。目前,对于红色元素硒生物活性的认识尚不清楚。1985年, Nuttal 在提出胶体状态红色元素硒具有或至少是在特定环境下具有生物活性的假说。纳米硒为博仕奥公司研制的,这种纳米粒子为红色,粒径在 20~60 纳米之间,本研究通过对纳米硒对尼罗罗非鱼生长的观察,发现较高剂量的纳米硒能明显提高尼罗罗非鱼的生长速度,且具有较低的毒性。这些结果拓宽了人们对纳米粒子形式的元素硒生物功效的认识,为寻找低毒高效硒形式的开辟了新途径。

1 试验材料与方法

1.1 试验饲料的准备

基础配方参照 Lovell(1989)配制。配方如下:酪蛋白(不含维生素)32%、明胶 8%、糊精 28%、纤维素 19%、混合脂肪① 6%、羧甲基纤维素 2%、混合无机盐② 4%、混合维生素③ 1%。其营养成分实测值为:粗蛋白 36.4%、粗脂肪 3.52%、粗灰份 12.74%, 总能 15.15×10^6 焦/千克。

试验饲料的配制:见表 1,分为 4 大组,分别添加入 Na_2SeO_3 (Sigma 公司)、蛋氨酸硒 (Met-Se, Sigma 公司)、纳米硒 (Nano-Se, 奥邦饲料公司提供)和对照组。试验组添加量分别为 0.1、0.5、2.5 毫克/千克干饲料。用逐级扩大混合的方法加入不同形态的硒,混匀后,用小型绞肉机制成直径 3 毫米左右的颗粒饲料,晾

干后密封使之与空气隔绝,置 -20°C 冰箱保存备用。

1.2 试验鱼及养殖条件

试验用尼罗罗非鱼由浙江省杭州市余杭区鱼场提供,试验鱼运回后,放入 2 个 400 厘米 \times 150 厘米 \times 100 厘米的水池中,用基础饲料驯养 2 周。

将驯养后的鱼随机放入装有封闭循环系统的 70 厘米 \times 50 厘米圆形水族箱中,平均初始体重为 14.68 ± 1.14 克,每箱 10 尾。水温控制在 $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, 24 小时充气增氧。试验期间,水的 pH 值为 6.9~7.2,溶氧值 7.5~9.5 毫克/升,氨氮含量不超过 0.25 毫克/升,亚硝酸盐氮含量不超过 0.2 毫克/升。每天吸污、换水,换水量为 1/4。试验期间光周期控制为白天 16 小时、黑夜 8 小时。

正式试验开始后,每组 3 个重复投喂相同的饵料,日投饵量按体重的 3% 投喂,上午 08:00 和下午 16:00 各投饵 1 次,根据鱼吃食情况,每星期调整投喂量,饲养期为 30 天。

1.3 样品分析

在最后 1 次投喂后 24 小时,将鱼用 MS-222 麻醉后称重。分别按有关公式计算尼罗罗非鱼存活率、体长(重)增长率、特定生长率、饵料系数。

1.4 不同形式的硒对尼罗罗非鱼的急性毒性

试验用鱼为饲养试验的同一批尼罗罗非鱼,在试验室内驯养 1 周后用于试验。放入盛有 180 升水的 100 厘米 \times 50 厘米 \times 50 厘米的装有封闭循环系统的玻璃水族箱中,每缸放鱼 10 尾。试验用水为经 1 周以上自然曝气的自来水(硬度为 20.1 毫克/升),试验 pH 为 7.15,溶解氧 6.4 毫克/升,试验水温恒定为 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

用亚硒酸钠、蛋氨酸硒和纳米硒用灭菌后的去离子水配制成适当浓度的溶液,用微量注射器按尼罗罗非鱼体重通过胸鳍分别将含硒量不同的溶液注射到其胸腔内,对照组注射去离子水,每个浓度设 2 个平行组,每天观察记录死鱼数量,连续观察 3 天,计算每个水箱的鱼的存活率,取其平均结果,试验数据用直线回归法计算 LC_{50} 值。

1.5 数据统计

数据用平均值 \pm 标准差表示,用

表 1 试验饲料中硒含量(毫克/千克干饲料)

组别	对照组	Na_2SeO_3 组			Met-Se 组			Nano-Se 组		
饲料编号	1号	2号	3号	4号	5号	6号	7号	8号	9号	10号
添加量	0	0.1	0.5	2.5	0.1	0.5	2.5	0.1	0.5	2.5
实测值	0.054	0.147	0.568	3.08	0.154	0.551	2.93	0.143	0.545	3.12

Duncan's 新复极差检验来进行方差分析(试验各指标数据的数理统计采用 SPSS10.0 软件), $P < 0.05$ 认为差异显著。

2 结果

2.1 不同形式的硒对尼罗罗非鱼生长的影响

经过 30 天的试验,不同形式的硒对尼罗罗非鱼生长影响结果见表 2。从表 2 可看出尼罗罗非鱼的存活率为 100%。不管硒的形式如何,饲料中低剂量的硒(0.1 毫克/千克)对尼罗罗非鱼都有一定的促生长效果,但效果不显著($P > 0.05$)。饲料中中等剂量的硒(0.5 毫克/千克)对尼罗罗非鱼都有显著的促生长效果,尼罗罗非鱼重量的增加与对照组比较差异显著(P

表 2 不同的硒源对尼罗罗非鱼生长的影响

	试验前 尾均重(克)	试验后 尾均重(克)	平均存 活率(%)	平均尾 增重(克)	平均相对 增重率(%)	饵料 系数
1号	9.27 ± 0.64	17.01 ± 0.76	100	7.54 ± 0.62a	51.92 ± 4.76a	1.73 ± 0.045
2号	9.71 ± 0.72	18.12 ± 0.58	100	8.27 ± 0.32ab	56.18 ± 2.26ab	1.67 ± 0.037
3号	9.59 ± 0.47	20.41 ± 0.64	100	10.69 ± 0.37c	73.57 ± 3.68c	1.72 ± 0.074
4号	9.54 ± 0.66	17.93 ± 0.79	100	8.34 ± 0.43a	57.97 ± 2.28a	1.72 ± 0.031
5号	9.13 ± 0.32	17.91 ± 0.45	100	7.93 ± 0.78a	61.21 ± 6.32a	1.69 ± 0.065
6号	9.23 ± 0.75	20.11 ± 1.27	100	10.27 ± 0.81c	72.93 ± 3.32c	1.62 ± 0.043
7号	9.08 ± 0.17	18.24 ± 0.69	100	9.14 ± 0.22ab	61.48 ± 1.72ab	1.79 ± 0.056
8号	9.65 ± 0.21	17.84 ± 0.12	100	8.14 ± 0.25ab	55.12 ± 3.44ab	1.66 ± 0.042
9号	9.11 ± 0.38	19.33 ± 1.43	100	10.26 ± 1.02c	71.35 ± 6.62c	1.75 ± 0.016
10号	9.52 ± 0.14	22.21 ± 1.41	100	12.51 ± 0.64d	86.25 ± 4.72d	1.69 ± 0.046

表中不同字母表示差异显著($P < 0.05$, Duncan's 检验)

< 0.05),虽然蛋氨酸硒组的尼罗罗非鱼增重率高于亚硒酸钠组和纳米硒组,但三者之间无显著差异($P > 0.05$)。饲料中高剂量的硒(2.5 毫克/千克)对尼罗罗非鱼生长的影响,不同的硒源差异较大,高剂量的亚硒酸钠组对尼罗罗非鱼增重的与对照组比较无明显差异($P > 0.05$);而高剂量蛋氨酸硒组尼罗罗非鱼增重率虽然比对照组高,但差异也不明显;高剂量的纳米硒对尼罗罗非鱼生长有强烈的促进作用,尼罗罗非鱼增重率达到 $86.25\% \pm 4.72\%$,高于对照组 $51.92\% \pm 4.76\%$,也高于中等剂量的硒尼罗罗非鱼的增加重率,差异显著($P < 0.05$)。饵料系数各试验组无明显差异。

2.2 硒对尼罗罗非鱼的急性毒性

表 3 是注射硒制剂后尼罗罗非鱼在 96 小时的存活率,按 Smyth H F 法计算出尼罗罗非鱼注射纳米硒的急性毒性(以硒计) LD_{50} 为 16.63 毫克/千克,95% 的可信限 12.86 ~ 21.92 毫克/千克,安全浓度为 1.49 毫克/千克;亚硒酸钠的急性毒性 LD_{50} 为 2.09 毫克/千克,95% 的可信限 1.53 ~ 2.82 毫克/千克,安全浓度为 0.188 毫克/千克;蛋氨酸硒的急性毒性 LD_{50} 为

表 3 注射不同形式的硒后尼罗罗非鱼的 96 小时成活率(%)

剂量 (毫克/千克)	对照组	亚硒酸钠	蛋氨酸钠	纳米硒
40	-	-	-	0
25	-	-	-	20
16	-	-	-	50
10	-	0	0	45
6.0	-	0	20	85
4.0	-	11	50	100
2.5	-	40	70	100
1.0	-	60	90	-
0.5	-	90	100	-
0.25	-	100	100	-
0	100	-	-	-

4.19 毫克/千克,95% 的可信限 3.27 ~ 5.48 毫克/千克,安全浓度为 0.377 毫克/千克。亚硒酸钠的急性毒性约为纳米硒的 8 倍,蛋氨酸硒的急性毒性约为纳米硒的 4 倍。

尼罗罗非鱼注射死亡剂量(注射后尼罗罗非鱼死亡率为 100%)的硒后,在水箱中急速游动,0.5 ~ 6 小时内,其肠道内容物大量排出,并很快死亡,解剖发现鱼内脏有出血点。注射中等剂量的硒后,部分鱼症状与注射高剂量硒相同并很快死亡,剩下的鱼出现停止摄食,对外界刺激反应迟钝,游动缓慢等症状,

5 ~ 7 天可恢复正常。试验中还发现,尼罗罗非鱼死亡一般发生在注射硒制剂后 48 小时内,存活下来的鱼通过 2 个月的饲养观察,未见死亡。

3 讨论

从结果可看出,饲料中硒含量为 0.5 毫克/千克时,亚硒酸钠、蛋氨酸硒及纳米硒都可有效地促进尼罗罗非鱼生长,但 3 种不同形式的硒对尼罗罗非鱼的促生长效果无明显差异。而饲料中硒含量为 3 毫克/千克时,亚硒酸钠和蛋氨酸硒对尼罗罗非鱼生长无促进效果,而纳米硒可极显著地促进尼罗罗非鱼的生长。

随着养殖业的发展,养殖鱼类的主要食物来源是人工饲料,而一般鱼类饲料中均富含脂质,这些脂质会在制造过程中因高温产生氧化现象,形成各种过氧化物,这些过氧化物经鱼类肠道吸收进入体内,由血液输送至各组织形成 O_2^- 或 OH^- 等具有强氧化力的游离基化合物,这类含游离基的化合物会攻击细胞膜上脂质双层中所含的不饱和脂肪酸,产生脂肪酸的过氧化,使组织遭受过氧化损伤。但此种反应所产生的游离基在生物体内可由 GSH-Px 加以分解。当饲料中缺乏硒时,会降低虹鳟肝脏及血浆中 GSH-Px 活性,因此推测硒在

基础研究

责任编辑/王冬武

鱼体内也担当着 GSH-Px 活性中心的作用。Cowey 认为鱼体在硒存在时可加快分解体内的游离基化合物,产生不具反应活性的代谢产物,从而降低其危害程度。

饲料中添加适宜剂量的硒可促进尼罗罗非鱼的生长。但过量的硒对鱼类有毒害作用,高剂量的硒对鱼类有一定的毒副作用, Richardson 等 (1984) 将硒作为饲料添加剂,含有 0.6, 6.6 和 11.8 毫克/千克的硒,他得出的结论是剂量 11.4 毫克/千克,连续喂 16 个星期,则虹鳟在温度 15℃ 时,身体重量减轻,死亡率增加。血球容量、血浆钙、血糖和蛋白质变化不大。90% 的虹鳟发生钙质沉积,鱼肾的钙含量明显增高,肝、肾的镁含量也明显增加,从显微观察看硒主要是引起肾损伤。

过量的硒对鱼类的毒害作用可能的机制是攻击特定的脱氢酶系统,尤其是琥珀酸脱氢酶,高浓度的硒化合物可产生活性氧自由基进而损伤生物组织 (Seko, et al, 1988)。

当饲料中添加较高浓度的亚硒酸钠和蛋氨酸硒时,硒化合物会对鱼产生毒害作用,阻碍鱼的生长;而添加较高浓度的纳米硒时,因纳米硒对尼罗罗非鱼的毒性较小,是亚硒酸钠的 12.5%,蛋氨酸硒的 25%,所以能促进尼罗罗非鱼的生长。

纳米粒子有不同于宏观和微观物质的特性。纳米硒中的硒原子比灰色元素硒和黑色元素硒中的硒原子有更活泼的化学性质。纳米硒的急性毒性很低的原因之一可能是纳米硒与生物体内 GSH 反应率低进而自由基产生量低。纳米硒粒子所具有的小尺寸效应、表面效应等特性都会使其表现出特殊的生物特性 (Ball et al, 1992; 张立得等, 1994)。

参考文献

- 1 张立得,牟季美. 纳米材料学[M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社,1994.
- 2 孔原,冷麟,徐万祥. 硒代半胱氨酸 (Selenocysteine): 密码表中二十一个氨基酸改[J]. 生物化学与生物物理进展,1989,16(6):326-327.
- 3 朱俭,曹凯鸣,周润琦,等. 生物化学实验[M]. 上海:上海科技出版社,1981. 127-136.
- 4 Ball P, Garwin L. Science at the atomic scale[J]. Nature, 1992, 355: 761-763, 761-763.
- 5 Bell J G, Adron J W, Cowey C B. Effect of selenium deficiency on hydroperoxide-stimulated release of glutathione from isolated perfused liver of rainbow trout (Salmo gairdneri) [J]. Br J Nutr, 1986, 56: 421-428.
- 6 Bell J G, Cowey C B, Adron J W, et al. Some effects of vitamin E and selenium deprivation on tissue enzyme levels and indices of tissue peroxidation in rainbow trout (Salmogairdneri) [J]. Br J Nutr, 1985, 53: 149-157.

- 7 Bell J G, Cowey C B. Digestibility and bioavailability of dietary selenium from fishmeal, selenium, selenomethionine and selenocystine in Atlantic salmon (Salmo salar) [J]. Aquac, 1989, 81: 61-68.
- 8 Cowey C B. Nutrients involved in the lipid anti-oxidant system of fish with particular reference to salmonids. Progress in Fish Nutrition, Proceedings of the fish nutrition symposium [M]. Marine Food Sci Series, 1989. 1-15.
- 9 Garbisu C, Gonzales S, Yang WH, et al. Physiological mechanisms regulating the conversion of selenite to elemental selenium by bacillus subtilis [J]. biofactors, 1995, 5(1): 29-35.
- 10 Hilton J W, Hodson P V, Slinger S J. The requirement and toxicity of selenium in rainbow trout (Salmo gairdneri) [J]. J Nutr, 1980, 110: 2 527-2 535.
- 11 Nuttal K L. Elemental selenium and glutathione reductase [J]. Ned Hypotheses. 1985, 16(2): 155.
- 12 Rotruck J T, Pope A L, Ganther H E, et al. Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase [J]. Science, 1973, 179: 588-590.
- 13 Richardson H B D, Hilton J W, Ferguson H W. Influence of dietary selenium on the occurrence of nephrocalcinosis in the rainbow trout. Salmogairdneri [J]. J Fish Dis, 1984, 7(5): 379-389.
- 14 Scott M L. The selenium dilemma [J]. J Nutr, 1972, 103: 803-810.
- 15 Stadtman T C. Selenium biochemistry [J]. Science, 1974, 183: 915-921.
- 16 Poston H A, Combs G F, Leibovitz L. Vitamin E and selenium interrelations in the diet of Atlantic salmon (Salmo salar): gross, histological and biochemical deficiency signs [J]. J Nutr, 1976, 106: 892-904.
- 17 Seko Y, Saito Y, Kitahara J. Active oxygen generation by the reaction of selenite with reduced glutathione in vitro [M]. The Forth International Symposium of Selenium in Biology and Medicine, 1988.
- 18 Thorarinsson R, Landolt M L, Elliott D G, et al. Effect of dietary vitamin E and selenium on growth survival and the prevalence of Renibacterium salmoninarum infection in chinook salmon (Oncorhynchus tshawytscha) [J]. Aquac, 1994, 121: 343-358.
- 19 Wise DJ, Tomasso J R, Gatlin D M, et al. Effects of dietary selenium and vitamin E on red blood cell peroxidation, glutathione peroxidase activity and macrophage superoxide anion production in channel catfish [J]. J Aquatic Ani Health, 1994, 5: 171-183.

(通联:广州市麓苑路42号2号楼403 广州博仕奥生物技术有限公司, 510095, 电话: 13326488973)