

文章编号: 1674 - 5566(2014)04 - 0535 - 11

氯化钴在大菱鲆饲料中的安全性评价

杨 沛, 李彦先, 胡海滨, 张彦娇, 麦康森, 艾庆辉, 徐 玮, 张文兵

(中国海洋大学 农业部水产动物营养与饲料重点实验室和海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘 要: 通过研究饲料中的氯化钴对大菱鲆幼鱼的存活、生长性能、血清生理生化指标、抗氧化酶活力、消化酶活力、血清和肝脏中 V_{B12} 含量、肌肉和肝脏中钴的残留量、肝脏和肠道组织结构的影响来评估氯化钴在海水鱼饲料中的安全性。通过在基础饲料中添加氯化钴制剂来配制 4 种具有不同氯化钴含量(0、8、40 及 80 mg/kg, 不计结晶水重量)的等氮等能的实验饲料, 每个饲料处理设 6 个重复, 每个重复养殖 30 尾大菱鲆; 养殖实验为期 10 周。实验结果表明: 饲料中添加氯化钴对试验鱼的存活没有显著影响($P > 0.05$), 但饲料中 80 mg/kg 的氯化钴显著降低了大菱鲆的特定生长率、终末体重、摄食率、肝体比和脏体比($P < 0.05$); 饲料中高剂量氯化钴(40 和 80 mg/kg)显著降低了大菱鲆血清过氧化氢酶、谷草转氨酶和碱性磷酸酶活力以及大菱鲆胃淀粉酶和胰蛋白酶活力($P < 0.05$); 大菱鲆的血糖含量、血清和肝脏中 V_{B12} 含量、肝脏和肌肉中钴的残留量均随饲料中钴的添加量增加而显著升高($P < 0.05$); 饲料中添加氯化钴对大菱鲆的肠道组织结构没有产生明显影响, 但饲料中添加 40 和 80 mg/kg 的氯化钴增宽了肝脏肝血窦。研究结果表明: 实验条件下, 氯化钴在大菱鲆饲料中的添加量 8 mg/kg 是安全的。

研究亮点: 本试验首次就氯化钴在大菱鲆饲料中的应用做出安全性评价, 针对氯化钴对大菱鲆的生长、血液生化、机体抗氧化、消化酶活力、组织钴残留和组织结构的影响进行了较为系统的研究, 评价了饲料中添加氯化钴的安全限量, 为深入研究大菱鲆矿物元素营养生理和大菱鲆商品饲料的科学配制提供重要依据。

关键词: 大菱鲆; 氯化钴; 安全评价

中图分类号: S 963.1

文献标志码: A

钴是动物体内必需的微量元素之一, 是 V_{B12} 和一些酶(如核糖核酸酶等)的组成成分, 主要以 V_{B12} 的形式发挥生物功能。 V_{B12} 是造血性维生素, 参与核酸、胆碱、蛋氨酸的合成以及脂肪与糖的代谢, 对肝脏和神经系统正常功能的维持也具有一定作用, 同时 V_{B12} 还是甲基丙二酰 CoA 变位酶和 5-甲基四氢叶酸甲基转移酶等多种酶的辅酶, 对调节体内丙酸和叶酸代谢具有重要作用^[1]。此外, 钴还能够直接参与造血过程^[2], 参与甲基转移和糖代谢, 增强反刍动物的消化功能, 并参与机体的氮吸收以及血红蛋白和肌红蛋白的合成^[3]。研究表明, 动物一旦缺钴, 就会出现异嗜、拒食、生长不良、消瘦和贫血等症状, 并引起血液中 V_{B12} 含量下降、甲基丙二酸(MMA)和同型半胱

胺(HCY)含量升高、红细胞减少及血红蛋白含量下降^[4-6]。鱼体内所有组织中都有钴的分布, 肝脏中钴的浓度最高, 其次为肾、心、脾、骨骼、肌肉、胰腺等^[7], 而且鱼类肠道中的微生物能够利用钴合成 V_{B12} 。对水产动物的研究表明饲料中适量的钴可以维持鱼类正常的生理代谢功能, 也可以一定程度上进一步促进生长, 但是在饲料中添加过量的钴会导致鱼体中毒, 出现消化道出血、白血球改变等症状(虹鳟)^[8-9], 抑制鱼的生长(草鱼)^[10]。

目前, 关于氯化钴(钴)在鱼类上的研究主要集中在不同鱼类对钴的需要量^[11-14], 但氯化钴饲料中的添加范围还没有统一的标准, 对其安全限量(即最高有效剂量)的评价更是处于空白阶

收稿日期: 2014-04-19

修回日期: 2014-05-23

基金项目: 农业部饲料质量安全监管项目(2013042); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金计划(BS2013SW007)

作者简介: 杨 沛(1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产动物营养与饲料学。E-mail: syau_peiyang@163.com

通信作者: 张彦娇, E-mail: yanjiaozhang@ouc.edu.cn

段。大菱鲆 (*Scophthalmus maximus* L.), 由于其生长快、抗逆性强、耐密养、肉质鲜美, 目前已成为我国北方海水养殖业的支柱之一, 本研究拟以大菱鲆为实验对象评价氯化钴在海水鱼饲料中的安全性, 为深入研究大菱鲆矿物元素营养生理和大菱鲆商品饲料的科学配制提供参考, 为大菱鲆安全健康养殖提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验设计与饲料配方

本试验方案根据农业部《饲料和饲料添加剂水产靶动物耐受性评价试验指南》(试行)进行设计和实施。根据 TACON 和 SILVA^[15]对欧洲市场占有率高的针对不同鱼种不同发育期的 38 种饲料的矿物质含量分析研究, 确定了本实验的有效

剂量组添加量为 8 mg/kg, 并依据此添加量设置了 2 个多倍剂量组(氯化钴添加量分别为 40 和 80 mg/kg)。

实验饲料(等氮等能)通过在基础饲料中添加不同含量的氯化钴试剂(购自四川省成都蜀星饲料有限公司, 生产批号为 130305, 钴元素的含量为 1%)来配制(表 1, 干物质基础), 各实验饲料中氯化钴(不含结晶水)的实际检测值分别为 <0.02、10.2、35.7 和 72.8 mg/kg。

配制饲料前, 饲料原料经粉碎机粉碎后全部过 80 目筛。原料按表 1 饲料配方混合均匀, 最后再加入大约 30% 的蒸馏水形成硬团, 于 F(II)-26 螺杆压条机(华南理工大学, 广州)中将饲料挤压成条状, 在 55 °C 恒温下干燥 8 h, 破碎, 置 -20 °C 冰箱保存。

表 1 基础饲料配方及成分分析

Tab. 1 Formulation and proximate composition of the basal diet

原料	氯化钴添加量/(mg/kg)			
	0	8	40	80
鱼粉	55	55	55	55
豆粕	6	6	6	6
玉米蛋白	6	6	6	6
啤酒酵母	3	3	3	3
面粉	22.55	22.51	22.37	22.19
鱼油	2	2	2	2
豆油	2	2	2	2
大豆卵磷脂	1	1	1	1
氯化胆碱(50%)	0.2	0.2	0.2	0.2
磷酸二氢钙	0.5	0.5	0.5	0.5
丙酸钙	0.1	0.1	0.1	0.1
乙氧基喹啉	0.05	0.05	0.05	0.05
三氧化二钨	0.1	0.1	0.1	0.1
预混料	1.5	1.5	1.5	1.5
氯化钴试剂(1%)/(mg/kg)	0	360	1 800	3 600
合计	100	100	100	100
成分分析				
干物质含量	96.19	96.47	96.27	96.05
粗蛋白	52.50	52.09	52.49	52.60
粗脂肪	9.42	9.31	9.53	9.58
粗灰分	12.36	12.57	11.09	11.21
氯化钴含量/(mg/kg)	<0.02	10.2	35.7	72.8

注: 鱼粉. 购于青岛七好生物科技有限公司(青岛), 其中粗蛋白 73%, 粗脂肪 10%; 维生素预混料(mg/kg 饲料). V_A 32, V_{B1} 25, V_{B2} 45, V_{B6} 20, V_{B12} 10, 烟酰胺 200, 肌酸 800, 泛酸钙 60, 生物素(V_H) 60, 叶酸 20, V_E 240, V_K 10, V_D 5, V_C 磷酸酯 2 000, 抗氧化剂 3, 微晶纤维素 6 470; 矿物质预混料(mg/kg 饲料). 硫酸镁(MgSO₄ · H₂O) 1 200, 硫酸亚铁(FeSO₄ · H₂O) 80, 硫酸锌(ZnSO₄ · H₂O) 50, 硫酸锰(MnSO₄ · H₂O) 45, 碘酸钙(Ca(IO₃)₂ 10%) 60, 亚硒酸钠(Na₂SeO₃) 20, 五水硫酸铜(CuSO₄ · 5H₂O) 10, 沸石粉 3 485; 氯化钴试剂(1%). 购自四川省成都蜀星饲料有限公司, 生产批号为 130305, 钴含量的标示值为 1%, 实测值为 1.05%。

1.2 实验动物及饲养管理

实验用大菱鲂 (*Scophthalmus maximus* L.) 幼鱼为当年人工培育的同一批苗种,购于山东莱州大菱鲂养殖场。实验前,幼鱼用对照组饲料暂养 2 周以适应养殖环境。正式养殖实验开始前将实验鱼禁食 24 h。选择大小均匀、初始平均体重为 (10.00 ± 0.08) g、体格健壮的幼鱼,随机分配于 24 个养殖桶中(300 L,4 个实验处理组,每组 6 个重复),每桶 30 尾鱼。每天表观饱食投喂两次(8:00,17:00)。投喂结束后 30 min,吸出残饵和粪便。实验共进行 10 周,养殖期间水温 16 ~ 20 °C,溶氧 > 7.0 mg/L,盐度 24 ~ 26,总氨氮 $\text{NH}_4^+ - \text{N} < 0.3$ mg/L,pH 7 ~ 8。

1.3 样品收集

养殖试验开始之前,随机捞取 20 尾实验用鱼于 -20 °C 保存用于初始鱼体成分的检测。饲养实验结束后,禁食 24 h 后称量每桶鱼体重,记录鱼的尾数。每桶取 4 尾鱼 -20 °C 保存用于鱼体常规成分分析。从每个重复中随机选取 9 尾大菱鲂,于尾静脉取血,血液置于 2 mL 离心管中,抽取血液过程要缓慢,防止血细胞因机械损伤而破裂,室温下静置 1 h 待其凝固后,置 4 °C 冰箱 4 h,于 4 °C 条件下 3 500 r/min 离心 10 min,收集血清。将上述抽过血的鱼随机选取 3 尾,取出肠道、胃和肝胰脏,剔除附着物,用去离子水清洗内容物,滤纸吸干水分,放入离心管中;剩余 6 尾取肝脏,放入离心管中,以上所有样品均迅速放入液氮中,-80 °C 冰箱中保存备用。取以上鱼体(3 尾)两侧肌肉 15 ~ 20 g;以鳃盖为前端,肛门为后端,去皮之后沿脊椎骨将肌肉平削下来,去除腹腔两侧鱼刺以及连带的其他鱼刺,放入样品袋中储存于 -20 °C 冰箱。每桶再随机取 3 尾鱼用于取肝脏和肠道样品制作组织切片:每尾鱼取约 0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm 大小的 3 块肝脏组织及约 1 cm 左右中肠中部肠道组织,将肝脏和肠道组织分别用 0.9% 生理盐水冲洗后,放入波恩氏固定液中。

1.4 指标测定方法

1.4.1 生长指标的测定

养殖期间记录每天水质条件和实验鱼死亡个数。

养殖结束后,分别对各桶鱼称重并统计存活率、终末体重、饲料效率、特定生长率等生长指

标。

1.4.2 鱼体成分分析

鱼体和饲料常规成分分析均采用 AOAC 法。其中,水分的测定为 105 °C 烘干恒重法(24 h);粗蛋白的测定为凯氏定氮法,采用丹麦 FOSS 公司 2300 型蛋白质自动分析仪分析;粗脂肪的测定为索氏抽提法;粗灰分的测定为箱式电阻炉 550 °C 灼烧法(16 h)。

1.4.3 形体指标和组织学分析

每桶随机取 3 尾鱼分别测量体重、体长(精确到 mm)计算肥满度,然后在冰上解剖,取内脏团和肝脏并称量,分别计算脏体比和肝体比。

固定的组织样品经乙醇逐级脱水,透明,透蜡,包埋,用组织切片机(Leica RM 2016)切片,最后用 HE 染色法染色。

肠道组织学分析参考 BAEVERFJORD 和 KROGDAH^[16]、ESCAFFRE 等^[17] 和 BONALDO 等^[18] 的方法,用 Nikon eclipse Ti-S 显微镜(日本)观察中肠组织形态变化,并测量肠道相关结构的数据,包括肠绒毛高度、微绒毛高度和肌层厚度。

1.4.4 血液生理生化指标测定

血液生化指标由日立 7600 全自动生化分析仪检测(青岛大学医学院附属医院)。

1.4.5 抗氧化指标测定

血清 SOD、CAT 测定采用相关高效专用试剂盒检测(南京建成生物工程研究所)。

1.4.6 消化酶活力测定

实验前将肠道、胃及肝胰脏冰上解冻,用预冷去离子水冲洗干净后剪碎。分别按试剂盒说明加入相应的匀浆介质,高速组织匀浆机冰浴匀浆,匀浆液于 4 °C 条件下 6 000 r/min 离心 30 min,收集上清液作为大菱鲂消化酶的粗提取液,置于 4 °C 冰箱中保存,24 h 内检测酶活力。

分别检测肠淀粉酶、胃淀粉酶、肠脂肪酶、胃脂肪酶、胃蛋白酶及胰蛋白酶的活力,相关检测均采用高效专用试剂盒进行(南京建成生物工程研究所)。

1.4.7 血清和肝脏中 V_{B12} 含量测定

准确称取肝组织样品,用预冷去离子水冲洗干净,于 4 °C 下剪碎,按样品重的 9 倍加入生理盐水(V/w),高速组织匀浆机冰浴下匀浆,匀浆液于 4 °C 条件下 6 000 r/min 离心 30 min,吸取上清液,用生理盐水稀释至适当浓度后送检;取血清

样品,用生理盐水稀释至适当浓度后送检;血清和肝脏中 V_{B12} 含量均采用罗氏 ZOBASe601 电化学发光免疫分析仪检测(青岛大学医学院附属医院)。

1.4.8 肌肉和肝脏中钴的残留量

将肌肉和肝脏于冷冻干燥机(德国 CHRIST Alpha 1-4)中冷冻干燥 12 h。然后采用高速粉碎机粉碎,样品前处理后,采用石墨炉原子化法检测肌肉和肝脏中钴的残留量(农业部饲料工业中心,北京)。

1.5 计算公式

生长指标计算公式:

$$S_R = N_t / N_0 \times 100 \quad (1)$$

$$S_{GR} = (\ln W_t - \ln W_0) / t \times 100 \quad (2)$$

$$F_{ER} = (W_t - W_0) / F \quad (3)$$

$$F_1 = 100 \times F / [(W_0 + W_t) / 2] / t \quad (4)$$

形体指标计算公式:

$$C_F = W / L^3 \quad (5)$$

$$H_{SI} = W_h / W \times 100 \quad (6)$$

$$V_{SI} = W_v / W \times 100 \quad (7)$$

式中: S_R 为成活率(%); S_{GR} 为特定生长率(%/d); F_{ER} 为饲料效率; F_1 为摄食率(%/d); C_F 为肥满度(g/cm^3); H_{SI} 为肝体比(%); V_{SI} 为脏体比(%); N_t 为实验结束时总尾数; N_0 为实验开始时总尾数; W_0 为鱼体初重(g); W_t 为鱼体末重(g);

W 为鱼体重(g); W_h 为鱼肝脏重(g); W_v 为鱼内脏重(g); L 为鱼体全长(cm); F 为摄食量(g); t 为饲养天数(d)。

1.6 数据统计

实验数据以平均值 \pm 标准误($\bar{X} \pm SE$)表示,所有数据用 SPSS 16.0 软件进行单因子方差分析(ANOVA),采用 Duncan's 多重比较检验差异的显著性,显著性水平选取 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 饲料中不同剂量的氯化钴对大菱鲆生长性能的影响

与对照组相比,饲料中添加 8、40 和 80 mg/kg 的氯化钴对大菱鲆的存活率、饲料效率均没有产生显著影响($P > 0.05$),但饲料中添加 80 mg/kg 的氯化钴显著降低了大菱鲆的末重、特定生长率和摄食率($P < 0.05$)。此外,大菱鲆的肥满度在各处理组间没有显著性差异($P > 0.05$),但饲料中添加 80 mg/kg 氯化钴显著降低了大菱鲆的肝体比和脏体比($P < 0.05$),见表 2。

与对照组相比,饲料中添加 8 和 40 mg/kg 氯化钴显著提高了鱼体蛋白含量($P < 0.05$),而 8 mg/kg 的饲料氯化钴显著降低了鱼体灰分含量,40 mg/kg 的饲料氯化钴显著降低了鱼体脂肪含量($P < 0.05$),见表 3。

表 2 饲料中不同剂量的氯化钴对大菱鲆生长性能的影响

Tab. 2 Effects of different dietary doses of cobalt chloride on growth performance of turbot

生长指标	氯化钴添加量/(mg/kg)			
	0	8	40	80
存活率/%	99.80 \pm 0.74	98.83 \pm 1.17	99.50 \pm 0.50	97.83 \pm 1.14
初始平均体重/g	9.97 \pm 0.02	10.00 \pm 0.02	10.00 \pm 0.02	9.97 \pm 0.01
终末平均体重/g	62.77 \pm 0.64 ^a	62.93 \pm 1.01 ^a	61.24 \pm 0.76 ^{ab}	59.23 \pm 1.57 ^b
特定生长率/(%/d)	2.86 \pm 0.01 ^a	2.86 \pm 0.02 ^a	2.82 \pm 0.02 ^a	2.74 \pm 0.03 ^b
饲料效率	1.32 \pm 0.02	1.35 \pm 0.02	1.32 \pm 0.01	1.36 \pm 0.02
摄食率/(%/d)	1.71 \pm 0.02 ^a	1.70 \pm 0.04 ^a	1.70 \pm 0.01 ^a	1.62 \pm 0.03 ^b
肥满度/%	3.41 \pm 0.09	3.43 \pm 0.07	3.40 \pm 0.04	3.29 \pm 0.03
肝体比/%	1.03 \pm 0.04 ^a	1.03 \pm 0.05 ^a	1.00 \pm 0.07 ^{ab}	0.86 \pm 0.05 ^b
脏体比/%	5.13 \pm 0.10 ^a	5.13 \pm 0.20 ^a	5.04 \pm 0.20 ^{ab}	4.61 \pm 0.10 ^b

注:同一行中具有相同上标字母的数值间没有显著性差异, $P > 0.05$;表 3-9 同。

表 3 饲料中不同剂量的氯化钴对大菱鲆体成分的影响

Tab. 3 Effects of different dietary doses of cobalt chloride on body composition of turbot

鱼体组成	氯化钴添加量/(mg/kg)			
	0	8	40	80
鱼体水分含量	86.60 \pm 0.49 ^{ab}	86.28 \pm 0.52 ^{ab}	86.16 \pm 0.33 ^b	87.53 \pm 0.43 ^a
鱼体蛋白含量	68.98 \pm 0.59 ^b	70.44 \pm 0.53 ^a	71.00 \pm 0.31 ^a	70.11 \pm 0.25 ^{ab}
鱼体脂肪含量	14.29 \pm 0.37 ^a	13.69 \pm 0.54 ^{ab}	13.12 \pm 0.17 ^b	14.06 \pm 0.17 ^{ab}
鱼体灰分含量	17.23 \pm 0.37 ^a	16.28 \pm 0.23 ^b	16.78 \pm 0.10 ^{ab}	16.53 \pm 0.13 ^{ab}

2.2 饲料中不同剂量的氯化钴对大菱鲆血清生理生化指标的影响

与对照组相比,饲料中添加 40 和 80 mg/kg 氯化钴显著降低了血清谷草转氨酶、碱性磷酸酶 ($P < 0.05$);而各处理组的血糖含量均出现了显著性升高 ($P < 0.05$),其他血液生化指标在各处理组间均没有显著性差异 ($P > 0.05$),见表 4。

2.3 饲料中不同剂量的氯化钴对大菱鲆血清抗氧化指标的影响

与对照组相比,饲料中添加 80 mg/kg 氯化钴显著降低了血清过氧化氢酶 (CAT) 水平 ($P <$

0.05),而血清超氧化物歧化酶 (SOD) 水平在各处理组间没有显著性差异 ($P > 0.05$),见表 5。

2.4 饲料中不同剂量的氯化钴对大菱鲆消化酶活力的影响

饲料中添加 40 和 80 mg/kg 氯化钴显著降低了大菱鲆胃淀粉酶活力 ($P < 0.05$),但显著提高了大菱鲆肠淀粉酶活力 ($P < 0.05$);饲料中添加 40 mg/kg 氯化钴显著降低了大菱鲆胰蛋白酶活力 ($P < 0.05$);而各处理组间胃蛋白酶活力、胃脂肪酶活力均与对照组无显著性差异 ($P > 0.05$),见表 6。

表 4 饲料中不同剂量的氯化钴对大菱鲆血清生理生化指标的影响
Tab.4 Effects of different dietary doses of cobalt chloride on serum physiological and biochemical parameters of turbot

血液生理生化指标	氯化钴添加量/(mg/kg)			
	0	8	40	80
总蛋白/(g/L)	32.91 ± 0.74	35.71 ± 1.55	35.43 ± 2.26	32.16 ± 1.67
白蛋白/(g/L)	6.12 ± 0.23	6.47 ± 0.29	6.09 ± 0.31	6.25 ± 0.26
球蛋白/(g/L)	26.79 ± 0.53	29.22 ± 1.32	27.62 ± 1.51	26.96 ± 1.34
白蛋白/红蛋白	0.23 ± 0.00	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.03	0.23 ± 0.03
总胆红素/(μmol/L)	0.17 ± 0.03	0.21 ± 0.06	0.24 ± 0.06	0.20 ± 0.04
谷丙氨酸转氨酶/(U/L)	16.5 ± 2.5	15.67 ± 2.09	15.6 ± 2.11	19.75 ± 3.99
谷草转氨酶/(U/L)	54.0 ± 1.15 ^a	51.67 ± 10.17 ^a	21.00 ± 1.00 ^b	23.0 ± 2.00 ^b
碱性磷酸酶/(U/L)	18.5 ± 0.65 ^a	18.0 ± 1.05 ^a	13.5 ± 1.26 ^b	11.67 ± 1.45 ^b
甘油三酯/(mmol/L)	1.75 ± 0.11 ^{ab}	1.94 ± 0.26 ^a	1.44 ± 0.18 ^{ab}	1.32 ± 0.08 ^b
总胆固醇/(mmol/L)	1.39 ± 0.08	1.73 ± 0.17	1.49 ± 0.17	1.35 ± 0.11
高密度脂蛋白/(mmol/L)	1.63 ± 0.09	2.09 ± 0.18	1.86 ± 0.13	1.78 ± 0.12
尿素氮/(mmol/L)	3.93 ± 0.09	4.47 ± 0.18	4.33 ± 0.15	4.28 ± 0.35
肌酐/(μmol/L)	29.6 ± 1.87	32.17 ± 1.38	30.17 ± 1.82	28.67 ± 2.28
血糖/(mmol/L)	0.63 ± 0.04 ^c	1.58 ± 0.08 ^a	1.09 ± 0.14 ^b	0.99 ± 0.08 ^b

表 5 饲料中不同剂量的氯化钴对大菱鲆血清抗氧化指标的影响

Tab.5 Effects of different dietary doses of cobalt chloride on serum antioxidases of turbot U/mL

免疫指标	氯化钴添加量/(mg/kg)			
	0	8	40	80
血清超氧化物歧化酶(SOD)	57.66 ± 1.41	53.52 ± 6.49	52.46 ± 3.65	49.79 ± 2.17
血清过氧化氢酶(CAT)	5.23 ± 0.43 ^a	4.12 ± 0.68 ^{ab}	4.91 ± 0.38 ^{ab}	3.22 ± 0.73 ^b

表 6 饲料中不同剂量的氯化钴对大菱鲆消化酶活力的影响

Tab.6 Effects of different dietary doses of cobalt chloride on digestive enzyme activity of turbot U/mg

消化酶活力	氯化钴添加量/(mg/kg)			
	0	8	40	80
胃淀粉酶	0.14 ± 0.00 ^a	0.12 ± 0.00 ^{ab}	0.11 ± 0.00 ^b	0.07 ± 0.00 ^c
肠淀粉酶	0.15 ± 0.01 ^c	0.14 ± 0.01 ^c	0.20 ± 0.02 ^b	0.23 ± 0.01 ^a
胃蛋白酶	0.98 ± 0.04	0.86 ± 0.21	1.12 ± 0.14	1.20 ± 0.17
胰蛋白酶	911.72 ± 24.56 ^a	915.28 ± 91.38 ^a	606.49 ± 59.22 ^b	845.68 ± 86.73 ^a
肠脂肪酶	9.92 ± 0.86 ^b	15.03 ± 2.92 ^a	10.59 ± 1.37 ^{ab}	9.65 ± 0.67 ^b
胃脂肪酶	7.65 ± 0.96	5.34 ± 0.76	7.51 ± 1.25	7.00 ± 2.24

2.5 饲料中不同剂量的氯化钴对大菱鲆血清和肝脏中 $V_{B_{12}}$ 含量的影响

饲料中添加氯化钴显著提高了肝脏中 $V_{B_{12}}$ 的含量 ($P < 0.05$), 但是添加氯化钴的各处理组

(8 ~ 80 mg/kg) 间没有显著性差异 ($P > 0.05$)。饲料中添加 80 mg/kg 氯化钴显著提高了血清中 $V_{B_{12}}$ 的含量 ($P < 0.05$), 见表 7。

表 7 饲料中不同剂量的氯化钴对大菱鲆血清和肝脏中 $V_{B_{12}}$ 含量的影响

Tab.7 Effects of different dietary doses of cobalt chloride on vitamin B_{12} concentrations in serum and liver of turbot

组织 $V_{B_{12}}$ 含量	氯化钴添加量/(mg/kg)			
	0	8	40	80
肝脏 $V_{B_{12}}$ /($\mu\text{mol/L}$)	1.80 \pm 0.29 ^b	2.50 \pm 0.21 ^a	3.56 \pm 0.51 ^a	3.55 \pm 0.67 ^a
血清 $V_{B_{12}}$ /(nmol/L)	43.45 \pm 2.18 ^b	44.96 \pm 2.50 ^b	51.02 \pm 5.28 ^b	67.50 \pm 7.75 ^a

2.6 饲料中不同剂量的氯化钴对大菱鲆肝脏和肌肉中钴残留量的影响

随着饲料中氯化钴添加量的增加, 大菱鲆肝脏和肌肉中钴的残留量逐渐升高。当氯化钴添

加量为 40 mg/kg 和 80 mg/kg 时, 肝脏中钴的残留量显著高于对照组 ($P < 0.05$)。肌肉中钴的最大残留量出现在 80 mg/kg 氯化钴处理组, 其显著高于其他 3 个处理组 ($P < 0.05$), 见表 8。

表 8 饲料中不同剂量的氯化钴对大菱鲆组织钴残留量的影响

Tab.8 Effects of different dietary doses of cobalt chloride on cobalt residues in liver and muscle of turbot

组织钴残留量	氯化钴添加量/(mg/kg)			
	0	8	40	80
肝脏中钴的含量	0.79 \pm 0.13 ^a	0.90 \pm 0.20 ^a	1.58 \pm 0.13 ^b	3.33 \pm 0.14 ^c
肌肉中钴的含量	0.58 \pm 0.01 ^a	0.57 \pm 0.01 ^a	0.57 \pm 0.01 ^a	1.16 \pm 0.02 ^b

2.7 饲料中不同剂量的氯化钴对大菱鲆肝脏、肠道组织结构的影响

不同处理组的大菱鲆中肠肠道形态结构、肝脏形态结构和肠形态统计数据分别如图版 I、图版 II 及表 9 所示。对肠道形态计量统计分析结果显示: 饲料中添加 8 mg/kg 氯化钴时, 大菱鲆肠道绒毛长度、微绒毛长度和肌层厚度与对照组

相比均显著升高 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 添加氯化钴的各处理组中肠肠道结构没有出现明显损伤或者变化。饲料中添加 0、8 mg/kg 氯化钴的处理组之间的大菱鲆肝脏组织结构没有明显的差异, 但氯化钴添加量为 40 mg/kg 时, 肝脏出现肝血窦增宽现象, 氯化钴添加量为 80 mg/kg 时肝血窦明显增宽 (图版 II 黑色箭头所指)。

表 9 饲料中不同剂量的氯化钴对大菱鲆中肠肠道形态计量的影响

Tab.9 Effects of different dietary doses of cobalt chloride on midgut intestinal morphometry of turbot

肠道结构	氯化钴添加量/(mg/kg)			
	0	8	40	80
中肠肌层厚度/直径/ %	2.49 \pm 0.12 ^b	3.89 \pm 0.18 ^a	2.92 \pm 0.18 ^b	2.87 \pm 0.14 ^b
中肠肠道绒毛/直径/ %	24.37 \pm 1.14 ^b	31.17 \pm 2.21 ^a	32.55 \pm 1.51 ^a	28.31 \pm 0.80 ^{ab}
中肠杯状细胞数目	37.12 \pm 2.85	42.80 \pm 4.28	44.20 \pm 2.89	41.27 \pm 1.77
(中肠绒毛微绒毛长度/直径)/%	0.81 \pm 0.02 ^b	1.08 \pm 0.07 ^a	0.91 \pm 0.06 ^b	0.81 \pm 0.04 ^b

3 讨论

3.1 饲料中不同剂量的氯化钴对大菱鲆生长的影响

在本实验中, 饲料中添加 0 ~ 40 mg/kg 的氯化钴对大菱鲆的生长没有产生显著性影响, 这与

在尼罗罗非鱼幼鱼 (0.15 ~ 4.33 mg/kg)^[13] 及牙鲆 (0 ~ 0.8 mg/kg)^[12] 中钴的相关研究结果类似。李爱杰^[19] 认为, 鱼体内钴存积的能力很小, 过量的钴会被迅速排出体外, 因此钴的营养需要量与有害量之间距离颇大; SHIAU 和 LUNG^[20] 认为鱼类的生长指标在许多微量元素需要量的研究中

表现不敏感尤其是在矿物元素研究中,LIN 等^[21]在对奥尼罗非鱼饲料中锰需要量的研究中也发现了相似的结果。但是在本实验中,饲料中添加 80 mg/kg 氯化钴降低了大菱鲆幼鱼的末重、特定生长率、摄食率、肝体比和脏体比。在小鼠中的研究表明,连续饲喂含钴的水能够降低小鼠增重率^[22]和摄食率^[23]并导致腹泻和降低体重^[24]。这表明过量的钴也有可能对大菱鲆的身体机能产生不良反应,阻碍其对营养物质的吸收利用,从而降低生长性能。另一方面,饲料中适量的钴对鱼类生长性能的促进作用也在一些养殖鱼类如团头鲂(23.4 mg/kg)、鲤(1.5%)、鲶鱼(0.1%)和草鱼(0.20 mg/kg)中得到过报道^[25-28]。饲料中钴对鱼类生长性能的影响可能与鱼种类、生长阶段及钴的添加形式和添加水平有关。

3.2 饲料中不同剂量的氯化钴对大菱鲆血液生理生化影响

饲料中添加不同剂量的氯化钴对大菱鲆幼鱼的大部分血液生理生化指标没有产生显著影响,但饲料中添加 40 和 80 mg/kg 氯化钴显著降低了血清谷草转氨酶、碱性磷酸酶,而各处理组的血清血糖含量则出现了显著性升高。已有的研究结果发现过量金属离子对鱼类碱性磷酸酶活力有抑制作用^[29-30],在日本沼虾和中国对虾中的研究也发现高浓度的 Co^{2+} 能够降低虾体内碱性磷酸酶的活性^[31-32]。血液谷草转氨酶与碱性磷酸酶是评价肝脏功能的重要指标,过高或过低的谷草转氨酶和碱性磷酸酶都标志着肝组织细胞完整性异常甚至肝脏组织病变的发生。此外,研究表明重金属暴露可引起明显的组织损伤方面指标的异常^[33-34]。在本实验中,饲料氯化钴添加量为 80 mg/kg 时,实验鱼的肝血窦明显增宽病变,说明饲料中过量的氯化钴对鱼体组织产生了不良的影响,相似的组织学变化也发生在连续 14 天饲饮含 350 mg/kg 氯化钴的初生小鼠体内^[35]。氯化钴对血糖含量的影响方面,已有研究发现氯化钴对糖尿病大鼠血糖含量的降低^[21]主要是通过增强由缺氧激活诱导因子 1(HIF-1 α) 介导的葡萄糖转运蛋白亚型的表达^[36-38],钴也可通过增加 GLUT1 的表达^[22]和抑制糖异生作用^[24]来降低链脲菌素腹腔注射诱导糖尿病小鼠的血糖含量。钴对鱼体血糖含量的影响鲜有研

究,鱼类对糖类利用率低,是天生的糖尿病体质,而本实验中投喂钴的实验鱼却表现出了与患糖尿病小鼠不同的血糖升高现象,其机制还需要进一步研究。

3.3 饲料中不同剂量的氯化钴对大菱鲆血清抗氧化指标的影响

钴可以增加机体活性氧引起机体氧化应激^[39],当机体抗氧化防御系统的超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)清除体内氧自由基的速率小于氧自由基合成速率时,这些氧自由基就可能引起细胞损伤^[40-42]。研究发现钴可降低小鼠肝脏 SOD 及 CAT 活力^[43]。本实验中氯化钴添加量为 80 mg/kg 时发现了相似的实验结果,饲料中高剂量的氯化钴降低了鱼体的抗氧化能力。

3.4 饲料中不同剂量的氯化钴对大菱鲆消化酶活力的影响

消化酶活力与鱼类的生长密切相关^[44],对消化酶活力的影响是饲料效应的一个重要方面^[45]。在本实验中,饲料中添加氯化钴显著影响了实验鱼的消化酶活力。目前关于钴对鱼类消化酶活力影响的研究非常少,对鲤的研究表明,饲料中添加钴(1%~2%)能够提高鲤鱼肠道淀粉酶、脂肪酶和蛋白酶活力^[26],这与本实验中饲料中添加氯化钴对肠道淀粉酶活力影响的结果相似,但本实验中其他消化酶活力的实验结果与在鲤鱼上得到的研究结果存在不同,这可能主要与鱼种类和发育阶段及钴的添加水平不同有关,其影响机制需要进一步的研究。

3.5 饲料中不同剂量的氯化钴对大菱鲆血清和肝脏中 V_{B12} 含量的影响

钴是动物体内必需的微量元素之一,是 V_{B12} 和一些酶(如核糖核酸酶等)的组成成分。 V_{B12} 是钴发挥其生物功能的主要形式,因此检测血清和肝脏中 V_{B12} 的含量可以部分反映出机体钴的代谢状况,本实验中,随着饲料中氯化钴添加量的增加,大菱鲆肝脏和血清中 V_{B12} 的含量均出现显著性升高,这与氯化钴在石斑鱼上的研究结果一致^[11]。

3.6 饲料中不同剂量的氯化钴对大菱鲆肝脏和肌肉中钴残留量的影响

肝脏是鱼体代谢的主要器官,也是钴的重要储存器官,因此肝脏钴存留量受饲料中钴含量影响比较大。同时肌肉也是钴代谢必经的场所^[10],

而且,因为肌肉是养殖鱼类主要的可食部分,其中钴的残留量是安全性评价的重要指标。本实验中,氯化钴添加量为 40 mg/kg 和 80 mg/kg 时,增加了肝脏和肌肉中钴的残留量,其中肌肉中钴的最大残留量出现在 80 mg/kg 氯化钴添加组,达到 1.16 mg/kg。根据 1972 年世界卫生组织推荐标准,人体钴最高可耐受摄入量为 350 μ g/天,可见高剂量添加氯化钴时,鱼体肌肉中的钴残留量可能会对人体造成不良影响。

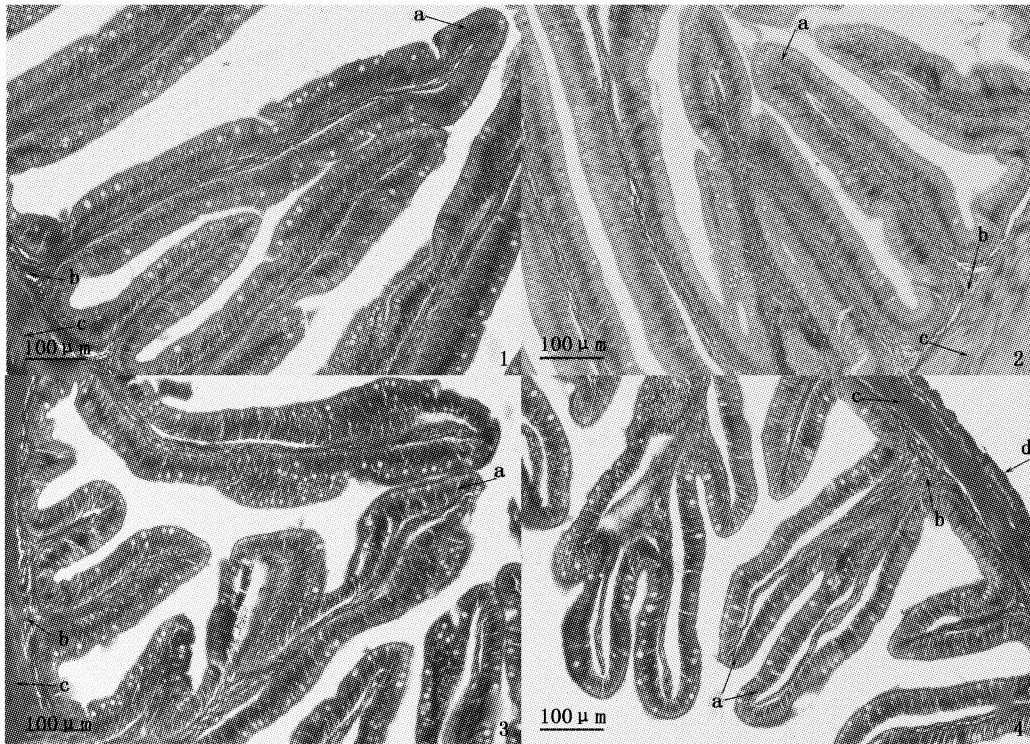
4 小结

本实验中,饲料中添加 8 和 40 mg/kg 的氯化钴对大菱鲆的生长性能没有产生显著性影响,但 80 mg/kg 的氯化钴显著降低了大菱鲆的生长性能,并升高了血糖含量、血清和肝脏中 $V_{B_{12}}$ 含量以及肝脏和肌肉中钴的残留量。饲料中添加 40 和 80 mg/kg 的氯化钴显著影响了大菱鲆的消化酶活力,降低了血清谷草转氨酶、碱性磷酸酶活力,同时导致了肝脏组织病变。而饲料中 8 mg/kg 的氯化钴提高了肠道绒毛长度、微绒毛长度和肌层厚度,对肠道形态起到了改善作用。综上所述,在本实验条件下,大菱鲆饲料中添加 8 mg/kg 氯化钴是安全的。

参考文献:

- [1] MCDOWELL L R. Minerals in animal and human nutrition [M]. Elsevier Science BV, 2003:277-296.
- [2] 卢德勋,张子仪. 饲料的组合效应 [M]//张子仪. 中国饲料学, 2000:289-294.
- [3] WATANABE T, KIRON V, SATOH S. Trace minerals in fish nutrition [J]. Aquaculture, 1997, 151(1): 185-207.
- [4] KENNEDY D G, CANNAVAN A, MOLLOY A, et al. Methylmalonyl-CoA mutase and methionine synthetase in the tissues of cobalt-vitamin B12 deficient sheep [J]. British Journal of Nutrition, 1990, 64(3): 721-732.
- [5] MBURU J N, KAMAU J M, BADAMANA M S. Changes in serum levels of vitamin B12, feed intake, liveweight and hematological parameters in cobalt deficient small east African goats [J]. International Journal for Vitamin and Nutrition Research, 1992, 63(2): 135-139.
- [6] KENNEDY D G, KENNEDY S, BLANCHFLOWER W J, et al. Cobalt-vitamin B12 deficiency causes accumulation of odd-numbered, branched-chain fatty acids in the tissues of sheep [J]. British Journal of Nutrition, 1994, 71(1): 67-76.
- [7] HENRY P R, LITTELL R C, AMMERMAN C B. Bioavailability of cobalt sources for ruminants. 1. Effects of time and dietary cobalt concentration on tissue cobalt concentration [J]. Nutrition Research, 1997, 17(6): 947-955.
- [8] STEFFENS W. Principles of fish nutrition [M]. Ellis Horwood Limited, 1989: 384.
- [9] HERTZ Y, MADAR Z, HEPHER B, et al. Glucose metabolism in the common carp: the effects of cobalt and chromium [J]. Aquaculture, 1989, 76(3): 255-267.
- [10] 袁丹宁, 文华, 蒋明, 等. 草鱼幼鱼对饲料中钴的需要量 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2009 37(5): 74-80.
- [11] LIN Y H, WU J Y, SHIAU S Y. Dietary cobalt can promote gastrointestinal bacterial production of vitamin B12 in sufficient amounts to supply growth requirements of grouper [J]. Aquaculture, 2010, 302(1): 89-93.
- [12] 魏万权, 李爱杰, 李德尚. 牙鲆幼鱼饲料中锰、钴适宜添加量的初步研究 [J]. 浙江海洋学院学报: 自然科学版, 2001, 20(s1): 83-87.
- [13] 刘伟, 文华, 蒋明, 等. 尼罗罗非鱼幼鱼饲料中钴需要量的研究 [J]. 湖北农业科学, 2011, 50(19): 4021-4025.
- [14] LOVELL R T, LIMSUWAN T. Intestinal synthesis and dietary nonessentiality of vitamin B12 for *Tilapia nilotica* [J]. Transactions of the American Fisheries Society, 1982, 111(4): 485-490.
- [15] TACON A G J, de SILVA S S. Mineral composition of some commercial fish feeds available in Europe [J]. Aquaculture, 1983, 31(1): 11-20.
- [16] BAEVERFJORD G, KROGDAHL Å. Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine: a comparison with the intestines of fasted fish [J]. Journal of Fish Diseases, 1996, 19(5): 375-387.
- [17] ESCAFFRE A M, KAUSHIK S, MAMBRINI M. Morphometric evaluation of changes in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) due to fish meal replacement with soy protein concentrate [J]. Aquaculture, 2007, 273(1): 127-138.
- [18] BONALDO A, PARMA L, MANDRIOLI L, et al. Increasing dietary plant proteins affects growth performance and ammonia excretion but not digestibility and gut histology in turbot (*Psetta maxima*) juveniles [J]. Aquaculture, 2011, 318(1): 101-108.
- [19] 李爱杰. 水产动物营养与饲料学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 59.
- [20] SHIAU S Y, LUNG C Q. No dietary vitamin B12 required for juvenile tilapia [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A Physiology 1993, 105(1): 147-150.
- [21] LIN Y H, LIN S M, SHIAU S Y. Dietary manganese requirements of juvenile tilapia [J]. Aquaculture, 2008, 284(1): 207-210.
- [22] YBARRA J, BEHROOZ A, GABRIEL A, et al. Glycemia-lowering effect of cobalt chloride in the diabetic rat: increased GLUT1 mRNA expression [J]. Molecular and

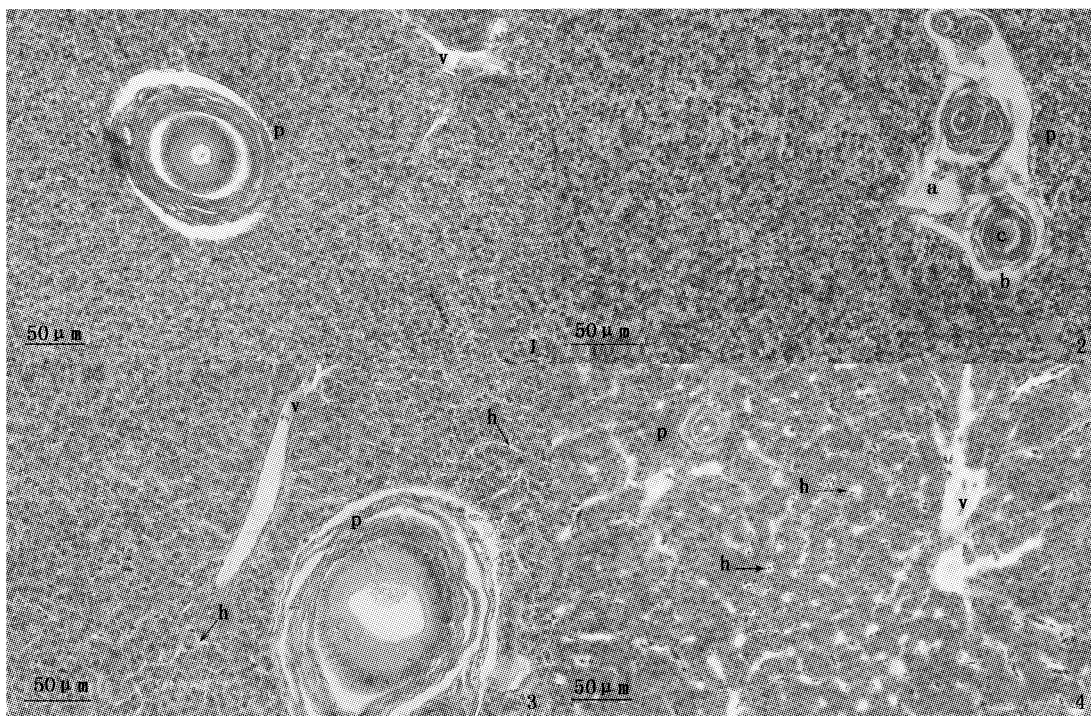
- Cellular Endocrinology, 1997, 133(2): 151-160.
- [23] VASUDEVAN H, MCNEILL J H. Chronic cobalt treatment decreases hyperglycemia in streptozotocin-diabetic rats [J]. *Biomaterials*, 2007, 20(2): 129-134.
- [24] SAKER F, YBARRA J, LEAHY P, et al. Glycemia-lowering effect of cobalt chloride in the diabetic rat; role of decreased gluconeogenesis [J]. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 1998, 274(6): 984-991.
- [25] 赵振山, 徐毅刚. 团头鲂配合饲料中锰和钴添加量的研究[J]. *水利渔业*, 1995, 75(1): 22-24.
- [26] AL-GHANEM K A. Effect of cobalt-supplemented diets on bioaccumulation, digestive enzyme activities and growth of *Cyprinus carpio* [J]. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 2011, 93(5): 985-995.
- [27] MUKHERJEE S, KAVIRAJ A. Bioaccumulation of cobalt, digestive enzyme activities, and growth of freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch), fed cobalt-supplemented diets [J]. *Toxicological & Environ Chemistry*, 2011, 93(3): 575-584.
- [28] 袁丹宁. 饲料中添加钴对草鱼幼鱼生长和生理, 生化指标的影响[D]. 武汉:华中农业大学, 2009.
- [29] 蓝伟光, 陈霓, 杨少楷. 重金属对真鲷肝脏碱性磷酸酶活性的综合影响[J]. *海洋学报(中文版)*, 1993, 15(1): 92-97.
- [30] 张辉, 张海莲. 碱性磷酸酶在水产动物中的作用[J]. *河北渔业*, 2003(5): 12-13, 32.
- [31] 王维娜, 王安利, 孙儒泳. 水环境中的铜锌铁钴离子对日本沼虾消化酶和碱性磷酸酶的影响[J]. *动物学报*, 2001, 47(专刊): 72-77.
- [32] 刘存岐, 王安利, 王维娜, 等. 海水中几种金属离子对中国对虾幼体内碱性磷酸酶和ATPase的影响[J]. *水产学报*, 2001, 25(4): 298-303.
- [33] TRIPATHI G, SHUKLA S P. Malate and lactate dehydrogenases of a freshwater catfish: impact of endosulfan [J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 1990, 3(1): 52-64.
- [34] MISHRA R, SHUKLA S P. Endosulfan effects on muscle malate dehydrogenase of the freshwater catfish *Clarias batrachus* [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2003, 56(3): 425-433.
- [35] GAROUI E M, FETOUI H, AYADI MAKNI F, et al. Cobalt chloride induces hepatotoxicity in adult rats and their suckling pups [J]. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2011, 63(1): 9-15.
- [36] BADR G A, ZHANG J Z, TANG J, et al. Glut1 and glut3 expression, but not capillary density, is increased by cobalt chloride in rat cerebrum and retina [J]. *Molecular Brain Research*, 1999, 64(1): 24-33.
- [37] CHAVEZ J C, LAMANNA J C. Activation of hypoxia-inducible factor-1 in the rat cerebral cortex after transient global ischemia: potential role of insulin-like growth factor-1 [J]. *The Journal of Neuroscience*, 2002, 22(20): 8922-8931.
- [38] LEE M, HWANG J T, LEE H J, et al. AMP-activated protein kinase activity is critical for hypoxia-inducible factor-1 transcriptional activity and its target gene expression under hypoxic conditions in DU145 cells [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(41): 39653-39661.
- [39] OLIVIERI G, HESS C, SAVASKAN E, et al. Melatonin protects SHSY5Y neuroblastoma cells from cobalt-induced oxidative stress, neurotoxicity and increased β -amyloid secretion [J]. *Journal of Pineal Research*, 2001, 31(4): 320-325.
- [40] DI MASCIO P, MURPHY M E, SIES H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols [J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1991, 53(1): 194-200.
- [41] MATES J M, PEREZ-GOMEZ C, de CASTRO I N. Antioxidant enzymes and human diseases [J]. *Clinical Biochemistry*, 1999, 32(8): 595-603.
- [42] DATTA K, SINHA S, CHATTOPADHYAY P. Reactive oxygen species in health and disease [J]. *National Medical Journal of India*, 2000, 13(6): 304-310.
- [43] CHRISTOVA T Y, DURIDANOVA D B, SETCHENSKA M S. Enhanced heme oxygenase activity increases the antioxidant defense capacity of guinea pig liver upon acute cobalt chloride loading: comparison with rat liver [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2002, 131(2): 177-184.
- [44] NWANNA L C. Effect of dietary phytase on growth, enzyme activities and phosphorus load of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Journal of Engineering and Applied Sciences*, 2007, 2(6): 972-976.
- [45] KESHAVANATH P, GANGADHARA B, KHADRI S. Growth enhancement of carp and prawn through dietary sodium chloride supplementation [J]. *Aquaculture Asia*, 2003, 8(4): 4-5.



图版 I 饲料中不同剂量的氯化钴对大菱鲆中肠形态的影响

Plate I Effects of different dietary doses of cobalt chloride on midgut intestinal morphology of turbot

1. 氯化钴添加量 0 mg/kg 组; 2. 氯化钴添加量 8 mg/kg 组; 3. 氯化钴添加量 40 mg/kg 组; 4. 氯化钴添加量 80 mg/kg 组; a. 小肠绒毛; b. 粘膜下层; c. 肌层; d. 外膜。



图版 II 饲料中不同剂量的氯化钴对大菱鲆肝脏形态结构的影响

Plate II Effects of different dietary doses of cobalt chloride on liver morphology of turbot

1. 氯化钴添加量 0 mg/kg 组; 2. 氯化钴添加量 8 mg/kg 组; 3. 氯化钴添加量 40 mg/kg 组; 4. 氯化钴添加量 80 mg/kg 组; p. 门管区; v. 中央静脉; a. 小叶间静脉; b. 小叶间动脉; c. 小叶间胆管; h. 黑色箭头所指为增宽的肝血窦。

Safety evaluation of dietary cobalt dichloride in turbot

YANG Pei, LI Yan-xian, HU Hai-bin, ZHANG Yan-jiao, MAI Kang-sen, AI Qing-hui, XU Wei, ZHANG Wen-bing

(Key Laboratory of Aquaculture Nutrition and Feed, Ministry of Agriculture, and the Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong, China)

Abstract: The effects of dietary cobalt dichloride on survival, growth performance, haematological parameters, antioxidases activities, digestive enzymes activities, V_{B12} contents in serum and liver, tissue cobalt residues, and intestinal and liver morphology of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) were studied for safe utilization of cobalt dichloride in fish feed. The experimental dietary cobalt dichloride inclusion level was 0, 8, 40 and 80 mg/kg respectively. Six replicates of 30 fish were used for each treatment group. No mortality was observed during the 10-week feeding trial. Growth performances of fish were not significantly affected by dietary cobalt dichloride supplementation from 0 to 40 mg/kg ($P > 0.05$), however, 80 mg/kg dietary cobalt dichloride significantly decreased the final weight, specific growth rate, final weight, feed intake, hepatosomatic index, and viscerosomatic index ($P < 0.05$). Supplementation of 40 and 80 mg/kg cobalt dichloride in diet decreased activities of catalase, aspartate transferase, and alkaline phosphatase in fish ($P < 0.05$). The activity of stomach amylase was significantly decreased by dietary supplementation of 40 and 80 mg/kg cobalt dichloride ($P < 0.05$), while dietary supplementation of 40 mg/kg cobalt dichloride significantly decreased the activity of trypsin ($P < 0.05$). With increasing level of dietary cobalt dichloride, the glucose and V_{B12} content in serum and liver and the cobalt residue in liver and muscle increased significantly ($P < 0.05$). No lesion or damage was found in intestinal structures of fish from all treatments. However, 40 and 80 mg/kg dietary cobalt dichloride impaired the liver tissue and widened the hepatic sinusoid. The present results proved that 8 mg/kg cobalt dichloride was safe as additive in fish feed.

Key words: turbot(*Scophthalmus maximus*); cobalt dichloride; safety evaluation