
* 研究简报 *

微囊藻毒素环境行为的初步研究

徐立红 周炳升 张甬元 徐 盈

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

原田健一

(名城大学药学部, 名古屋 468, 日本)

THE PRELIMINARY STUDY OF ENVIRONMENTAL BEHAVIOUR OF MICROCYSTINS

Xu Lihong, Zhou Bingsheng, Zhang Yongyuan and Xu Ying

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Ken-ichi Harada

(Meijo University, Nagoya 468, Japan)

关键词 微囊藻毒素, 定量测定, 环境行为

Key words Microcystins, Quantitative determination, Environmental behavior

微囊藻毒素 (Microcystins, 简写 MCYST) 是蓝藻的微囊藻属 (*Microcystis*)、鱼腥藻属 (*Anabaena*)、颤藻属 (*Oscillatoria*) 及念珠藻属 (*Nostoc*) 的某些种或品系中产生的次生代谢物, 系环状多肽, 一般结构为: 环(D-丙氨酸-L-X-赤-β-甲基-D-异天冬氨酸-L-Y-Adda-D-异谷氨酸-N-甲基脱氢丙氨酸), 其中, Adda 为一种特殊氨基酸, 结构为 3-氨基-9-甲氧基-2, 6, 8-三甲基-10-苯-4, 6-二烯酸, X, Y 为两种可变的 L 氨基酸, 由于 X, Y 不同而产生近五十种微囊藻毒素, 其中存在最普遍, 含量也相对较多的是 LR, RR, YR, 其中 L, R, Y 分别代表亮氨酸, 精氨酸, 酪氨酸。由于水华发生越来越普遍和严重, 微囊藻毒素成为了一种广泛存在的天然有毒物。文献报道这类毒素的毒性作用最常见的是表现在引起急性肝中毒, 试验表明, 无论是腹腔注射或口服给药, 实验动物都会在极短时间内引起肝脏的严重损伤。虽然未象麻痹贝类毒素那样有对人类急性中毒事件发生, 但近年来发现, 这类毒素能抑制细胞蛋白磷酸酶, 因而相对增加了蛋白激酶 C 的活力, 成为强的肝肿瘤促进剂^[1], 因此对微囊藻毒素的研究已引起科学家的高度重视。

研究微囊藻毒素对生物的作用及可能带来的环境影响, 检测方法是一个重要的限制因素, 目前,

国家自然科学基金资助, 课题号: 39370151。

1994年4月20日

检测毒素的方法有生物测试, 化学分析、免疫检测技术及酶学方法。生物测试可较为粗略地判断藻提取物是否有毒性, 结果较为直观、快速, 但无法用于准确定量测定。化学检测目前主要是用 HPLC, TLC, 可作精确性定量测定, 而 ELISA 法和酶学方法对毒素测定则具较高的灵敏度^[2,3], 国外在这几项方法上发展很快, 国内尚无这方面的报道。本研究建立了用高效液相色谱法定量测定水华样品中几种微囊藻毒素的方法。同时考察了微囊藻毒素 LR, RR 在水中的稳定性及其它环境行为, 为探讨藻毒素对环境及最终对人可能造成的影响提供理论依据。

1 材料与方 法

实验中微囊藻 (*Microcystis* sp.) 在中国科学院水生生物研究所鱼塘或东湖在水华时采集。样品经 4000 r/min 离心后, 将离心管上层和底层的藻分别冻融 3 次, 然后冰冻干燥待测。

1.1 藻样毒素含量的测定方法 根据 Harada 等人的方法^[4], 称一定量干藻粉, 按 4:1 (mg:ml) 加入 5% 醋酸, 搅拌 30 min, 离心, 重复 3 次, 将合并的上清液过 Sep pak C₁₈ 小柱, 先用水洗, 然后用 3 ml 甲醇洗脱, 浓缩后用流动相溶解, 进行 HPLC 测定; 在藻样中加入已知量的藻毒素标样, 按上述步骤操作测定标样添加回收率; 同一藻同时做六个平行样, 计算方法的精密度。

1.2 藻毒素稳定性试验 研究无菌条件下微囊藻毒素的稳定性, 取一定量纯藻毒素 RR, LR 加入人工配制软水中, 室温下放置, 曝气, 不同时间取样测毒素含量。

在有菌而有机质含量不同的情况下进行藻毒素稳定性研究, 取一定量的藻细胞提取液和初步纯化(酸提取液离心后用 C₁₈ 小柱富集, 再用甲醇洗脱)的微囊藻毒素, 分别加入接种了一定比例池塘水的实验水中, 室温下放置, 曝气, 不同时间取样, 纯化后用 HPLC 法测定毒素含量, 实验温度 26—30℃。

1.3 毒素从微囊藻中的释放 将采集的鲜藻称湿重, 取一定量加至人工配制软水中, 避光, 曝气, 不同时间取样, 20000 g 离心, 然后分别测水中及固形物中毒素含量。

1.4 仪器及试剂 Waters 高效液相色谱仪, 型号 600 MS-490 MS-U6K-745B, COSMOSIL C₁₈ 柱, 3.9×150 mm。三种微囊藻毒素标样 RR, YR, LR, 甲醇为色谱纯, 其它试剂均为分析纯。

2 结果

2.1 色谱条件、方法回收率及精密度 微囊藻毒素是一种肽类物质, 实验中曾比较了几种类型的反相色谱柱, 包括 PICO TAG C₁₈ 柱, NOVA PAK C₁₈ 柱和 μ BONDAPAK C₁₈, 但很难将三种毒素

表 1 标样线性关系、平均回收率及精密度

Tab.1 Linear relationship, mean recovery and accuracy of the method

微囊藻毒素 Microcystins	LR	RR	YR
线性回归方程 Linear regression equation	$y=0.32+0.452x$ $r=0.9993$	$y=3.60+0.728x$ $r=0.9994$	$y=1.56+0.744x$ $r=0.9992$
平均回收率 Mean recoveries	97.97%	96.88%	91.6%
精密度及变异系数 Accuracy and coefficient of variation	454.77±31.39 6.9%	308.82±23.15 7.5%	44.73±2.66 5.9%

LR, RR, YR 分开, 无论怎样改变色谱条件, YR 总是与一种毒素同时从柱上洗脱, 而且重现性差。而 COSMOSIL C₁₈ 柱则效果较好, 三种标样的分离比较理想, 并且能很好的用于样品测定。在 0—50 ng 范围内毒素含量与峰面积有很好的线性关系, 并且该方法具较好的精密度及回收率, 结果见表 1。标样及水华样品的色谱分离图见图 1。

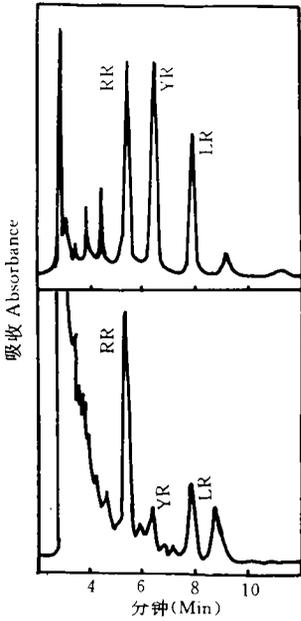


图 1 毒素标样及水华样品的 HPLC 图谱

流动相: MeOH/0.05MKH₂PO₄ (58:42) 检测波长: 238 nm
流速: 1.0 ml/min 柱: COSMOSIL C₁₈ 柱温: 30 ℃

Fig.1 HPLC chromatograph of microcystins standards and sample.

mobile phase: MeOH/0.05MKH₂PO₄ (58:42) λ: 238 nm
Temp.: 30 ℃ flow rate: 1.0 ml/min
column: COSMOSIL C₁₈

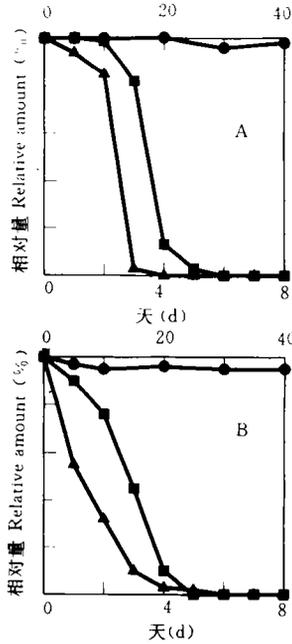


图 2 微囊藻毒素在水中的稳定性

A: LR, B: RR

Fig.2 Degradation of microcystin in sterilized and non-sterilized water. A: LR, B: RR

- 纯毒素 LR 或 RR
- 初步纯化的毒素
- ▲ 藻细胞提取液

2.2 微囊藻死亡时毒素的释放 在 2L 人工配制软水中加入 10 g 池塘采集的微囊藻, 在不同时间分别测定固形物及水中的微囊藻毒素 (表 2)。固形物中的毒素不断减少, 到 10 d 约为原含量的 20%。

2.3 微囊藻毒素稳定性测定 图 2 所示为微囊藻毒素 LR, RR 在无菌水及接种了池塘水而有机质含量不同的三种水中随时间变化的情况。接种了过滤池塘水的系统中存在一定种类和数量的细菌, 由图可看出, 当有细菌存在时, 藻毒素降解迅速; 而有机物含量的不同会影响毒素的稳定性; 无细菌时, 毒

表 2 藻死亡时水及固形物中毒素含量的变化

Tab.2 Changes of microcystin in water and precipitate during the decay of algae

时 间 Day	藻毒素 LR (ng / ml)	
	固形物中	水 中
0	91	0
6	6.9	0.2
10	1.6	0.2

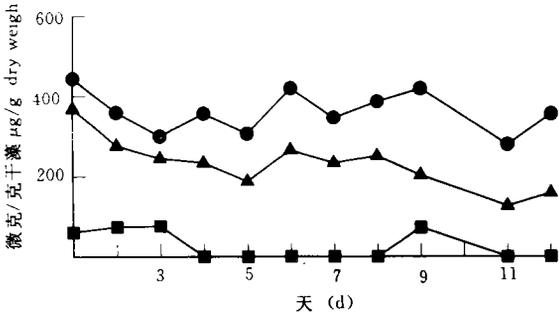


图3 东湖水华周期中微囊藻毒素的含量

Fig.3 Amount of microcystins in Donghu Lake during water bloom period.

● RR ■ YR ▲ LR

3 讨论

微囊藻毒素研究目前在国内已开始受到重视, 而定量检测方法尚未建立, 国外现在较多采用的是 ELISA 法和 HPLC 法, 前者具较高的检测灵敏度, 后者能对多种毒素分别进行定量测定。本研究所确定的 HPLC 方法重现性好, 并可对几种毒素同时测定, 对于微囊藻毒素的研究具有极重要的意义。

据文献报道, 水华时毒素 LR 在水体中的含量变化较大, 从图3可看到, 东湖水华毒素 YR 有时能测到, 有时测不出, 毒素 RR 含量比 LR 要高, Watanabe 等人的报道也有类似结果。铜绿微囊藻纯培养中, 在对数生长后期, 毒素 RR, YR, LR 含量都达最大, 而 RR 的量增加最多, 到稳定期后开始下降^[5]。本实验中发现水华周期内水华样品中微囊藻毒素含量有一定变化, 而整个周期中毒素总量处于较高水平, 与文献报道接近^[5,6], 国外几项研究证明微囊藻死亡后毒素会释放到水中^[6,7], 对水质产生影响^[8], 因此, 在水华周期里水中毒素含量可能将一直处于比较高的状态。Wicks 等人报道湖水中微囊藻毒素的含量及种类在一年中呈季节性变化并与环境因子有关^[5], 本研究中也发现 RR, YR, LR 含量在东湖与池塘中不同。

藻细胞解体后毒素去向及释放到天然水体后稳定性如何, 对于判断其生态毒理影响是一个重要依据。它在环境中的持久性愈长, 则其可能产生的危害也越大。日本学者 Watanabe 等人^[7]的研究表明, 在铜绿微囊藻培养物达最大细胞密度后, 停止光照, 然后观察藻细胞死亡过程中毒素的释放情况。发现在一段时间内, 存在于固形物包括藻和其它微生物中的藻毒素量与存在于水中的藻毒素量有很好的消长关系, 而到 42 d 后, 固形物中的毒素为零而水中毒素也开始下降, 这一现象被认为是由于细菌的作用所致。本研究中固形物里毒素的减少的规律与 Watanabe 等人的结果大致相似, 但减少的速度要快得多。两个实验结果的差异, 可能是由于本实验中加入藻密度较大, 而且其中含有其它微生物, 藻死亡分解速度快, 有机物剧增, 使异养细菌生长快, 加速了毒素的降解。Tsuji 等人的微囊藻毒素稳定性实验发现, 环境中色素的存在可以加速微囊藻毒素的分解^[9], 这与本研究的结论是相似的。本研究中稳定性实验证明, 当有细菌存在时, 毒素降解明显加速, 有机物含量高时, 降解过程更迅速。尽管藻毒素在有菌条件较易降解, 但对于用作饮用水的水体, 当有微囊藻存在时, 因不断释放,

素很稳定。

2.4 水华周期中微囊藻细胞内毒素的变化

为考察水华过程中微囊藻细胞内藻毒素 LR、RR、YR 含量的变化规律, 实验中还分别观察了池塘和武汉东湖围隔 (enclosure) 中水华的情况。经镜检, 确认为微囊藻水华, 从水华形成至消失, 约持续半个月, 在此期间定期采集藻样, 测定三种毒素的含量。本实验中所测到的毒素的总量范围为, 池塘 655—820 μg/g 干藻, 东湖 300—800 μg/g 干藻, 图3为在东湖的一个水华周期中采集水华样品所测定的藻毒素的含量变化。

水中会有一定量的毒素, 从而影响水质并对人类具有潜在危害, 必须引起足够的重视。

对 MCYST 的研究已进行多年, 早期的工作多以哺乳动物为材料, 主要研究 MCYST 的毒性作用。其毒性已是十分肯定, 但它致毒的机制、可能对人类造成的危害及途径等问题尚在进一步研究探索中。当考虑可能对人带来的影响时, 环境行为是必须要考虑的因素。Watanabe^[6]用三种浮游动物研究发现微囊藻毒素可在脆弱象鼻蚤中富集两倍, 他们提出毒素有可能被某些生物富集。因此, MCYST 是否会经食物链在鱼体中浓缩, 在鱼体中的代谢情况等, 这些都值得进一步进行深入研究。

参 考 文 献

- [1] 徐立红, 张甬元, 微囊藻毒素分子致毒机理研究近况. 水生生物学报, 1993, 17(4): 365—374.
- [2] Chu F S et al, Enzyme-linked immunosorbent for microcystins in blue-green algal blooms. *J Assoc of Anal Chem*, 1990, 73: 451—456.
- [3] Gaete V et al, Inhibitory effects of *Microcystis aeruginosa* toxin on ion pumps of the gill of freshwater fish. *Toxicon*, 1994, 32: 121—127.
- [4] Harada K-I et al, Improved method for purification of toxic peptides produced by cyanobacteria. *Toxicon*, 1988, 25(5): 433—439.
- [5] Wicks, R. J. et al, Environmental factors affecting the production of peptide toxin in floating scums of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in a hypertrophic Africa reservoir, *Environ. Sci. Technol.* 1990, 24, 1413—1418.
- [6] Watanabe, M. M. et al, Fate of the toxic cyclic heptapeptides, the microcystins, from blooms of microcystins (cyanobacteria) in a hypertrophic lake. *J. Phycol.*, 1992, 28, 761—767.
- [7] Watanabe, M. F. et al, Release of heptapeptide toxin (microcystin) during the decomposition process of *Microcystis aeruginosa*. *Natural Toxins*, 1992, 1: 48—53
- [8] Berg, K. et al, Effects of decaying toxic blue-green algae on water quality—a laboratory study. *Arch. Hydrobiol.* 1987, 108, 549—563.
- [9] Tsuji, K. et al, Stability of microcystins from cyanobacteria: effect of light on decomposition and isomerization. *Environ. Sci. Technol.* 1994, 28: 173—177.