

## 产毒微囊藻藻粉的脱毒技术研究

沈 强 刘永定 宋立荣 沈银武 李敦海

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

**摘要:** 为了达到对收获的微囊藻藻粉安全脱毒的目的, 分别使用了调节 pH, NaClO 处理和臭氧处理微囊藻干粉, 并检测其脱毒效果和脱毒过程中蛋白质的损失率, 以期找到一种可行的微囊藻藻粉安全脱毒方法。研究结果表明, 调节 pH 值的方法试剂用量大且脱毒不彻底; NaClO 处理也因对藻粉的渗透性较差而效果不佳。臭氧水溶液处理藻粉, 处理时间短, 且脱毒彻底, 有实际应用前景。

**关键词:** 微囊藻藻粉; 脱毒; 微囊藻毒素

中图分类号: 949.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2004)02-0137-04

微囊藻水华是世界各国湖泊、池塘中分布广, 持续时间长的一种产毒藻类水华<sup>[1]</sup>。这类藻类产生的微囊藻毒素(Microcystins)是结构为环状七肽的小分子, 它们存在于蓝藻的微囊藻属(*Microcystis*)、鱼腥藻属(*Anabaena*)、颤藻属(*Oscillatoria*)及念珠藻属(*Nostoc*)的某些种或品系中<sup>[2]</sup>。微囊藻毒素的毒性作用最常见的表现是引起急性肝中毒。微囊藻毒素进入生物体内对蛋白磷酸酶1和2A起抑制作用, 从而被认为是促肝癌剂<sup>[3]</sup>。最近几年的研究认为微囊藻、节球藻(*Nodularia*)等产毒藻类产生的微囊藻毒素和节球藻毒素(*Nodularin*)是现在促癌剂中促癌力较强的毒素。此类毒素化学结构较稳定, 能够在浮游动物和鱼体内富集和残留, 并能通过生态系统、食物链对人类造成潜在威胁<sup>[4, 5]</sup>。

昆明滇池近年来频繁发生的水华即是以微囊藻为优势种群。经检测, 其微囊藻种群的优势度可常年维持在 80% 以上, 滇池采集收获的微囊藻水华中微囊藻毒素含量很高。在目前对滇池水华危害的治理工作中, 机械收获微囊藻是一项已经投入实施的方案。收获的微囊藻水华具有生物量大和蛋白质含量高的特点, 若能在安全消除藻类毒素的前提下, 用其作为生产生物肥料或提取有价值的生物活性成分的原料, 将具有一定应用前景和经济价值。但由于微囊藻含有难以降解的微囊藻毒素, 不仅大大限制

了其应用价值, 而且若不及时处理, 会对环境带来一定危害。因此, 对微囊藻藻粉的脱毒与安全处理势在必行。根据以往的国内外文献, 对微囊藻毒素的脱毒多集中在对水体中微囊藻毒素的消除方面, 如: 氯气处理<sup>[6]</sup>、O<sub>3</sub> 处理<sup>[7]</sup>、光降解<sup>[8, 9]</sup>及活性炭处理、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理等<sup>[7]</sup>, 而对固态有毒藻粉的安全脱毒及利用方面, 则少有文献报道。本文在以往文献的基础上, 采用几种处理方法, 对收获的微囊藻藻粉的实用脱毒技术进行了研究。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 微囊藻采集自昆明滇池, 用 25 号浮游生物网收获滇池微囊藻水华, 晒干制成微囊藻干藻粉。经 HPLC 检测测定, 藻粉中微囊藻毒素含量为 1.09%, 其中, MC-RR 含量为 0.848%, MC-LR 含量为 0.242%。经 LC-MS 分析还含有微量的 MC-YR, MC-[Dha]<sup>7</sup>-LR, MC-AR。水电解式臭氧发生器, 由武汉大学化学学院提供, 臭氧浓度可达 20% 左右, 臭氧产率在 10mg/min。实验用小鼠为昆明小鼠, 体重 12—15g, 雄性。由湖北医学实验动物中心提供。

**1.2 调节 pH 处理微囊藻藻粉** 采用 NaHCO<sub>3</sub> 调节 pH。分别取 NaHCO<sub>3</sub>: 0, 1.0, 2.0 和 5.0g, 各加 50mL 蒸馏水, 再各加入 5.0g 干藻粉, 混匀后搅拌 2—3h,

收稿日期: 2003-02-19; 修订日期: 2003-11-10

基金项目: 科技部云南省重大课题(K99-05-35-01); 国家 973 项目(2002CB412300); 中国科学院方向性创新课题(220316); 中国科学院重大项目(KZCX1-SW-12)资助

作者简介: 沈 强(1975—), 男, 河南潢川人, 博士, 主要从事藻类学及藻类毒素毒理学研究

通讯作者: 刘永定, liuyd@ihb.ac.cn

反复冻融 4 次, 4℃存放 24h(pH 值依次为: 6.7、7.9、8.2、8.5)。将上述样品分别稀释相应的倍数, 调整 pH 值至 7.0, 分别用生物检测法(Bioassay, 小白鼠腹腔注射)检测处理后藻粉的毒性。

**1.3 NaClO 处理微囊藻藻粉** 取微囊藻干粉 10.0g、NaClO 10.0mL、蒸馏水 100mL, 置于三角瓶中冻融处理后, 搅拌 2—3h, 4℃存放 24h。稀释一定的倍数, 调整 pH 值至 7.0, 生物检测法测试处理后藻粉的毒性。

**1.4 臭氧( $O_3$ )处理微囊藻藻粉** 取 7 只试管, 分别加入微囊藻干粉 0.5g 和蒸馏水 10mL, 混合均匀。用水电解式臭氧发生器产生的臭氧通入各试管中, 分别用 0、60mg、150mg、300mg、1500mg、2100mg、3600mg 臭氧处理。将各材料分别用超声波处理 1min 以粉碎藻渣, 将毒素和蛋白质完全释放出来后, 分别用生物检测法检测处理后藻溶液的毒性, 并用考马斯亮蓝 G 250 染色法测定处理后藻溶液的可溶性蛋白质含量。

## 2 结果

### 2.1 调节 pH 处理微囊藻干粉

从实验结果(图 1)可以看出, 尽管使用了较大剂量的  $NaHCO_3$ (与微囊藻干粉质量比分别为 1:5、2:5、1:1), 但微囊藻干粉的毒性的  $LD_{50}$  只从 0.10g/kg 提高到 0.23—0.28g/kg 左右, 即提高 2—3 倍左右, 毒素脱毒率在 56%—64% 左右。由此可见,  $NaHCO_3$  处理在微囊藻干粉脱毒中效率不高, 不具备应用价值。

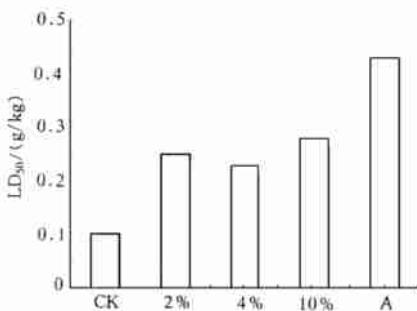


图 1 不同浓度  $NaHCO_3$  和  $NaClO$ (A) 处理对微囊藻藻粉毒性的作用

Fig. 1 Effect of  $NaHCO_3$  and  $NaClO$ (A) on the toxicity of the algal powder of *Microcystis*

### 2.2 NaClO 处理微囊藻藻粉

经过 10%  $NaClO$  处理后, 微囊藻干粉的毒性的  $LD_{50}$  从 0.10g/kg 提高到 0.43g/kg, 毒素脱毒率为 77%, 脱毒效果优于  $NaHCO_3$ , 但仍有相当一部分毒

素残余。试验结果不能令人满意。如图 1 所示。

### 2.3 臭氧( $O_3$ )处理微囊藻藻粉

如图 2、图 3 所显示, 经过臭氧处理后, 微囊藻干粉的  $LD_{50}$  在短时间内迅速上升, 标志着毒性急剧降低。从臭氧处理 15min(即臭氧处理量为 150mg 臭氧/克干藻)以后, 微囊藻毒素的毒性已经降低到用生物测试法无法检出的程度。为了探明臭氧处理对微囊藻蛋白质含量带来的负面影响, 特测定了样品中的可溶性蛋白质含量。结果发现, 蛋白质含量还是有较大损失, 150mg 臭氧/g 干藻量处理后可溶性蛋白质含量下降 50% 以上。

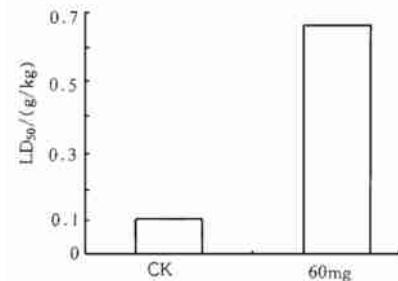


图 2 臭氧处理对微囊藻藻粉毒性的作用

Fig. 2 Effect of  $O_3$  on the toxicity of the algal powder of *Microcystis*

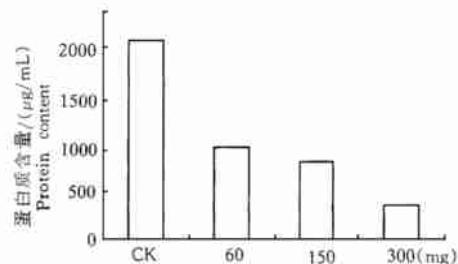


图 3 臭氧处理后藻溶液的可溶性蛋白质含量

Fig. 3 Dissolvable protein concentration after being treated with  $O_3$   
注: 用 150mg、300mg、1500mg、2100mg、3600mg 剂量臭氧处理藻粉后  
生物测试检测均为无毒

## 3 讨论

$NaHCO_3$  处理藻粉是利用调节 pH 值来改变微囊藻毒素分子的结构, 以达到降低藻粉毒性的效果。 $NaClO$  处理则是利用  $NaClO$  在水中分解产生的  $ClO^-$ 、 $Cl_2$  等强氧化物来氧化分解微囊藻毒素, 来达到脱毒的目的。曾有报道  $NaClO$  对水体中微囊藻毒素的去除效果较好<sup>[7]</sup>, 而在本实验中,  $NaClO$  对藻粉的脱毒效果比用  $NaHCO_3$  效果好, 但仍有一部分毒素残余, 可能由于产生的游离氯对藻粉的渗透性较差导致。将  $NaClO$  用于对新鲜微囊藻的脱毒处理可

能会起到较满意的效果。

臭氧是自然界中仅次于  $F_2$  的强氧化剂, 臭氧的氧化电势非常高, 为 2.076 伏, 大大高于常用氧化剂氯的氧化还原电势 (1.36 伏)。其氧化能力是氯的两倍, 杀菌能力是氯的数百倍。臭氧有迅速扩散通过微生物膜的能力。由于藻类毒素分子中存在不饱和双键 (如  $C=O$ ,  $C=C$  等), 臭氧分子能迅速作用于藻类毒素中的不饱和键并将其氧化降解而达到彻底脱毒的目的。因臭氧在有水的环境下氧化能力进一步提高, 所以将微囊藻干粉置于水环境中进行臭氧脱毒实验。最后通过对处理后的样品进行残余毒性的准确监测, 完全可以达到消除毒性或安全利用含藻类毒素的水源及各种天然生物资源 (包括微囊藻水华) 的目的。

对比以上三种化学试剂对微囊藻藻粉的脱毒效果, 调节 pH 和  $NaClO$  处理有一定的效果, 但脱毒不彻底且大剂量使用易给环境带来污染。臭氧对藻粉的脱毒具有高效快捷的特点, 并且不会对环境造成二次污染的优点, 有一定应用价值。脱毒后的藻渣蛋白质仍保持一定含量, 可以考虑用作农肥的原料。随着目前新型的臭氧发生器的问世, 成本已经越来越低, 可以考虑运用到实际操作中。

#### 参考文献:

[ 1 ] He J W, He Z R, Yu J L. Isolation and characterization of toxins from *Microcystis aeruginosa* in Lake Donghu [ J ]. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 1988, **19**( 5 ): 424—430. [ 何家莞, 何振荣, 俞

家禄等. 东湖铜绿微囊藻毒素的分离与鉴定. 海洋与湖沼, 1988, **19**( 5 ): 424—430 ]

[ 2 ] Ingrid Chorus and Jamie Bartram. *Toxic Cyanobacteria in Water* [ M ]. Great Britain: St Edmundsbury Press, 1999

[ 3 ] Infante A. and Riechl W. The effect of cyanophyta upon zooplankton in a eutrophic tropical lake [ J ]. *Hydrobiologia*, 1984, **113**( 29 ): 293—298

[ 4 ] Li X Y, Song L R, Liu Y D. The production, detection and toxicology of microcystins [ J ]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1999, **23**( 5 ): 517—523 [ 李效宇, 宋立荣, 刘永定. 微囊藻毒素的产生、检测和毒理学研究. 水生生物学报, 1999, **23**( 5 ): 517—523 ]

[ 5 ] Zhou B S, Xu L H, Zhang Y Y, et al. The effect of microcystin LR on the liver ultrastructure of grass carp, *ctenopharyngodon idellus* [ J ]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1998, **22**( 1 ): 90—92 [ 周炳升, 徐立红, 张甬元, 等. 微囊藻毒素 LR 对草鱼肝脏超微结构影响的研究. 水生生物学报, 1998, **22**( 1 ): 90—92 ]

[ 6 ] Nicholson B C, Rositano J, Burch M D. Destruction of cyanobacterial peptide hepatotoxins by chlorine and chloramine [ J ]. *Water Res*, 1994, **28**: 1297

[ 7 ] Linda A. Lawton and Peter K. J. Robertson. Physico-chemical treatment methods for the removal of microcystins (Cyanobacterial hepatotoxins) from potable waters [ J ]. *Chem. Soc. Rev.*, 1999, **28**: 217—224

[ 8 ] Kaya K, Sano T. A photodetoxification mechanism of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin LR by ultraviolet irradiation [ J ]. *Chem. Res. Toxicol.*, 1998, **11**( 3 ): 159

[ 9 ] Zhang W H, Fang T, Xu X Q. Study on photodegradation of cyanobacterial toxin in blooms of Diandi Lake [ J ]. *China Environmental Science*, 2001, **21**( 1 ): 1—3. [ 张维昊, 方涛, 徐小清. 滇池水华蓝藻毒素光降解的研究. 中国环境科学, 2001, **21**( 1 ): 1—3 ]

## STUDIES ON DETOXIFICATION TECHNIQUES OF TOXIC ALGAL POWDER OF *MICROCYSTIS*

SHEN Qiang, LIU Yong-Ding, SONG Li-Rong, SHEN Yin-Wu and LI Dun-Hai

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

**Abstract:** The harmful algal blooms (HABs) continually occurred in Dianchi Lake in recent years, and the harmful *Microcystis aeruginosa* is the dominant species. In the project on the control of HABs in Dianchi Lake, gathering the microcystis with machine is now used on a large scale. The bloom of *Microcystis* has high protein content and a big amount of biomass, and it can be used as the raw material of fertilizer in the agricultural production. Since microcystins produced by *Microcystis* are very difficult to degrade, the utilization of the raw materials is restricted. Furthermore, if the removal or degradation of microcystins can't be carried out in time, the possible risk of microcystins to environment will be inevitable. Thus the detoxification and safe treatment of microcystis powder is necessary.

In order to detoxicate the algal powder of *Microcystis* harvested from Dianchi Lake, three methods, the pH value adjustment, NaClO treatment and O<sub>3</sub> treatment, were applied to deal with the algal powder. We measured the effect of detoxification and the loss of protein after the treatments. The result showed that the former two methods (the pH value adjustment and NaClO treatment) didn't work well. With pH adjustment, the detoxication rate of the algal powder was 50%—66%, while it was 77% when NaClO treatment was used. The disadvantage of this method is that the application of a big amount of chemicals will cause environmental pollution. However, when 150mg/g of O<sub>3</sub> was applied for per gram of dry algal powder, we found that it can detoxificate the algal powder in a short time and have a good effect. So, this method has a good prospect in practice.

**Key words:** Algal power of *Microcystis*; Detoxification; Microcystins