

研究简报

滇池束丝藻水华毒性生物检测

刘永梅 刘永定 李敦海 沈银武 王海珍

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

BIOASSAY FOR THE TOXICITY OF *APHANIZOMENON FLOS-AQUAE* BLOOM FROM LAKE DIANCHI

LIU Yong-Mei, LIU Yong-Ding, LI Dun-Hai, SHEN Yin-Wu and WANG Hai-Zhen

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

关键词: 蓝藻水华; 水华束丝藻; 生物检测; 麻痹性贝毒毒素

Key words: Cyanobacterial bloom; *Aphanizomenon flos-aquae*; Bioassay; Paralytic shellfish poison (PSP)

中图分类号: X174 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2004)02-0216-03

近年来, 由于外源污染物大量入湖, 致使滇池水体呈富营养状态, 蓝藻水华频繁爆发^[1]。束丝藻属与微囊藻属随季节演替, 成为滇池蓝藻水华的两大优势种群。束丝藻水华暴发期间, 滇池放养的滤食性鱼类出现死亡, 其原因可能是由于丝状藻体堵塞鱼鳃部而引起, 但也不能排除束丝藻毒素的影响。有毒束丝藻水华对鱼类的危害主要表现在几个方面: 鱼类受到有毒束丝藻细胞所分泌毒素, 如四氢嘌呤碱等毒性毒害; 与束丝藻共生细菌毒害; 或束丝藻死亡后分解消耗水体中溶解氧造成水体缺氧等都是可以使鱼致死的原因^[2]。由于束丝藻高产毒的特性使之已成为普遍关注的热点之一^[3]。国外曾报道蓝藻水华产生的毒素使牛和野生动物中毒死亡^[4,5], 而滇池束丝藻水华毒性尚未见报道。本文采用一种国际常用的检测方法——小白鼠腹腔注射法, 对滇池束丝藻水华的毒性进行了检验。

1 材料与方法

1.1 材料 水华束丝藻从滇池蓝藻水华中用浮游植物网采集。带回实验室后, 依次过 100、150、300 目筛网, 除去浮游动物及枯草等杂质。将浓缩的藻浆铺于滤纸上脱水。实验用昆明小白鼠(KM)购自中国科学院昆明动物研究所, 属昆明品系, 雄性, 体重 18—22g。

1.2 样品采集时水体理化因子测定 水温、pH、溶解氧(DO)

采用日本 DKK TOA 公司生产的 HM-20P、DO-24p 水质自动测定仪进行测定。总氮采用过硫酸钾氧化—紫外分光光度法测定, 总磷采用过硫酸钾氧化—钼锑抗分光光度法测定^[6]。

1.3 藻类种群优势度确定 样品用 Lugol's solution 固定后, 采用血球计数板进行群体计数。

1.4 干重测定 称取 1g 经浓缩获得的鲜藻体, 105℃ 烘干至恒重, 称重为 0.041g。

1.5 粗毒素的提取 称取鲜藻体 18.85g, 加入 50mL 0.1mol/L 乙酸溶液, 用 JY92-II 型超声波细胞破碎仪(宁波新芝生物技术研究)处理 15min, 再用磁力搅拌器搅拌 30min, 5000r/min 离心 15min, 收集上清。向沉淀部分再加入 25mL 0.1mol/L 乙酸溶液, 重复上述操作, 离心, 合并上清, 得到毒素粗提品。

1.6 毒素粗提物初步纯化处理 向粗提物中加入 10mL 无水乙醇, 混匀, 以沉淀蛋白质和核酸等大分子。将混合物 4200r/min 离心 15min, 收集上清, 并用旋转蒸发仪浓缩干燥。浓缩的样品用 0.1mol/L 乙酸重新溶解, 再加入 10mL 无水乙醇, 重复操作。将最终所得浓缩样品用 50mol/L 0.01mol/L 乙酸溶解, 得到比较澄清的毒素提取物, 并用 1mol/L NaHCO₃ 调 pH 值为 6 左右。

1.7 小鼠生物实验 按照 AOAC 小鼠生物检测方法, 采用纯种昆明小白鼠。毒素提取物用 0.01mol/L 乙酸适当稀释, 并调 pH 为 6。将 18 只小鼠按体重分为 6 组, 每组平均体重均为

收稿日期: 2003-11-17; 修订日期: 2003-12-10

基金项目: 国家 973 项目(2002CB412300); 国家重大环境课题(K99053501); 中国科学院方向性创新课题(220316)资助

作者简介: 刘永梅(1979—), 女, 河南唐河人, 博士, 从事藻类生物学研究

通讯作者: 刘永定, liuyd@ihb.ac.cn

20.33±1.58g, 以 pH 为 6 的乙酸溶液为对照组, 按毒素提取物原液、1/2、1/4、1/8、1/16 毒素提取物原液的梯度进行腹腔注射, 每组 3 个重复。根据 Sommer' S 表^[7], 用小鼠体重及死亡时间进行校正, 确定材料的毒性, 以鼠单位(MU)表示。其定义为 15min 内使小鼠中毒致死所需的毒素量^[8]。实验组小鼠死亡后立即解剖, 取肝脏和肺, 用 pH7.2 的磷酸缓冲液冲洗去血后, 称重。同时与注射 1mL 微囊藻毒素死亡的小鼠进行比较。

1.8 提取物中微囊藻毒素检测 用高效液相色谱仪(HPLC-UV)对提取物中微囊藻毒素含量进行测定。色谱条件: 岛津

ODS 柱(4.6mm × 150mm), 检测波长 238nm, 流动相为 60% 甲醇, 40% 磷酸缓冲液(0.05mol/L KH₂PO₄, 调 pH 为 3), 流速为 1.0mL/min, 进样量 10μL。

2 结果与讨论

2.1 束丝藻水华暴发时水体理化条件及样品优势度

束丝藻水华在滇池暴发时环境温度较低, 水体偏碱性, 采样同时测定结果如表 1。

表 1 采样时滇池水体理化指标
Tab. 1 Physical and chemical values of the water in Dianchi Lake when sampling

水温(℃) Water temp.	pH	溶解氧(mg/L) Dissolved oxygen	总氮(mg/L) Total nitrogen	总磷(mg/L) Total phosphorus
12.8	8.89	7.45	3.122	0.313

根据近三年来(2000—2008 年)对滇池实验区 25 个采样点每月取样监测结果, 滇池束丝藻在每年的 11 月份开始出现, 到次年的 3、4 月份消失, 在此期间大量生长, 形成水华。而对这期间滇池水体理化参数的监测结果(未列出)表明, 在束丝藻与微囊藻水华的季节演替过程中, 温度变化是一个与该过程相关性较大的因子。束丝藻水华暴发时要求的环境温度较低, 一般为 10℃左右, 不超过 15℃; 当 3、4 月份滇池表面水温达 17℃以上时, 束丝藻水华很快消失, 取而代之的是微囊藻形成的水华。另外, 光照强度可能也是束丝藻水华暴发的一个关键因子。滇池束丝藻水华暴发的环境依赖因子, 还有待进一步研究。

样品(1mL)经镜检发现, 绝对优势的是水华束丝藻(*Aphanizomenon flos-aquae*.) 占 82.1%(23 × 10⁵ind./mL), 其次是少量的微囊藻(*Microcystis* sp.) 占 7.14%(2 × 10⁵ind./mL)、鱼腥藻(*Anabaena* sp.) 占 3.57%(1 × 10⁵ind./mL) 及其它藻属的一些种。

2.2 小白鼠生物检测

各组小鼠在进行腹腔注射后几分钟内, 均略有不适感, 身体缩成一团, 可能是由于提取物的酸性引起的。但对照组和低浓度注射组随后即恢复正常, 可自如爬动、饮水和进食; 原液和高浓度注射组则表现出精神萎靡, 行动困难, 爬行时后肢麻痹、无力、拖地。十几分钟后, 即表现出典型的麻痹性贝毒毒素中毒症状^[8,9]: 肌肉颤动、痉挛、呼吸困难、张口、跳跃, 终因呼吸困难而死亡。由于本研究中小鼠中毒症状和死亡时间与报道的麻痹性贝毒致毒症状非常接近, 为对其毒性大小做一直观的表达, 本文按照麻痹性贝毒毒素的计算方法, 根据 Sommer' s 表计算受试材料的毒性为 1.36MU/mg 干藻。比 Paulo Pereira 等利用从 Montargil 水库中分离纯培养的水华束丝藻测得的毒性稍低^[8](2.23MU/mg), 但比 Lagos 报道的 *Cylindropspermopsis raciborskii* 的毒性(0.81MU/mg) 要高 0.68 倍。

从小鼠中毒症状及死亡时间看, 滇池束丝藻水华可能产生麻痹性贝毒毒素。注射高浓度毒素提取液时, 小鼠中毒死

亡时间出现在 30min 内, 而注射提取液浓度较低时, 小鼠死亡时间则相对较长, 出现在注射后的数小时内, 这可能是由于束丝藻毒素的延缓性毒性效应引起的^[10]。提取物的 HPLC 分析结果发现微囊藻毒素含量非常低, 且小鼠中毒症状并非为典型的肝毒素中毒症状(微囊藻毒素为肝毒素), 所以可以排除微囊藻毒素中毒致死的原因。小鼠解剖实验发现: 微囊藻注射组小鼠肝脏重量均超过体重的 7%(表 2), 肺部颜色亮白, 与对照组无差异; 而束丝藻提取物注射组小鼠肝脏均占体重不足 7%, 而肺部则颜色发红, 表现出充血, 组织受损。

表 2 微囊藻毒素和束丝藻提取物注射组小鼠肝/体重

Tab. 2 Liver/body weight of the mice injected with MG-LR and extracts of *Aphanizomenon* sp.

注射毒素 Toxin injected	微囊藻毒素 Microcystin LR	束丝藻提取物 Extracts of <i>Aphanizomenon</i> sp.
肝重/体重(%)		
Liver weight/Body weight	8.25±0.405	5.39±0.406

小鼠中毒症状和解剖实验结果分析表明, 本次采集的滇池束丝藻水华具有毒性, 并且可能是麻痹性贝毒毒素。有关滇池束丝藻水华产毒的种类和产量, 还有待进一步研究。

参考文献

[1] Wu W L, Lin X Y, Liu L P. *et al.*, Research of Toxins of Main Algae in the Dian Chi Lake[J]. *Yunnan Environmental of Sci.* 1997, **16**(2): 26—29 [吴为, 林雄毅, 刘丽萍, 等. 滇池水体中主要藻种毒素研究. 云南环境科学, 1997, **16**(2): 26—29]

[2] Huang Z M. Prevention and cure of *Aphanizomenon* bloom[J]. *Inland Aquiculture*. 1997, **11**(1): 24. [黄章梅. 束丝藻水华防治[J]. 内陆水产, 1997, **11**(1): 24]

[3] Miyoshi Ikava, John J Sasner, *et al.*, Pterins of the cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* [J]. *Phytochemistry*, 1995, **38**(5): 1229—

1232

[4] In: Lag J. Chemical Data as a Basis of Geomedical Investigations[M]. Oslo: The Norwegian Academy of Science and Letters, 1996, 197—216

[5] Mann N H, Carr N G. Photosynthetic Prokaryotes, Biotechnology Handbooks[M] , NewYork: Plenum Press, 1992, 211—231

[6] Wei F S, Monitoring and analysis methods of water and waste water(3rd edition) [M] . Beijing: Chinese Environmental Science Press, 1998, 278—285, 359—361. [魏复盛. 水和废水监测分析方法指南. 北京: 中国环境科学出版社, 1998, 278—285, 359—361]

[7] Hallgraff G M, Anderson DM, Cembella A D. Manual on harmful marine microalgae[M]. Paris: IOC Manuals and Guides UNESCO, 1995, 33

[8] Paulo Pereira, Paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*, isolated from Montargil reservoir, Portugal[J] *Toxicon* 2000, **38**: 1689—1702

[9] Jin C Y, He J W, Zhu J M, *et al.* Studies on Some Problems About Production of Paralytic Shellfish Toxins by *Aphanizomenon flos Aquae* NH-5 [J] . *Acta Hydrobiologica Sinica* . 2000, **24**(1): 94—96 [金传荫, 何家苑, 朱家明, 等. 水华束丝藻 NH-5 株产生麻痹性贝毒素几个相关问题的研究 [J] . 水生生物学报, 2000, **24**(1): 94—96]

[10] Bjørn Undeland, Protracted toxic effects caused by saline extracts of *Aphanizomenon flos aquae* (Cyanophyceae/ Cyanobacteria) [J] . *Aquatic Toxicology* 1999, **46**: 269—278