

武汉东湖蓝藻水华毒性的研究 I. 淡水蓝藻毒性的检测

俞家禄 陈明惠 林坤二 俞敏娟

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

提 要

用国外检测蓝藻水华毒性的血凝法和小白鼠腹腔注射藻类提取液法。对武汉东湖蓝藻水华进行检测。发现八月份到十月份其间的藻类水华有不同程度的毒性反应。

关键词 蓝藻, 水华, 毒性, 血凝反应

湖泊, 水库是我国城市居民饮用水的主要来源。近十多年来由于城镇工业的迅速发展和城市人口的增加, 生活污水和部分工业污水大量排入湖泊致使湖泊渐渐富营养化。每当温暖季节湖泊中浮游蓝藻大量繁殖并且形成水华时, 严重影响水质和环境卫生。这种蓝藻水华是否会突变产生毒株而影响人体健康, 正在日益引起供水机构和公共卫生部门的关注。

早在一百多年前, Francis 第一次发表了某些蓝藻水华引起动物中毒的报告。1900 年就有水华束丝藻 (*Aphanizomenon flos-aquae*) 引起牛中毒的报道。六十年代中期又有许多文章报道蓝藻水华引起动物甚至于人中毒的情况。Schwimmer^[7] 综述中报道多起北美洲大平原的湖泊, 水库和池塘使动物中毒事例。在欧洲, 亚洲, 非洲, 大洋洲及南美洲也有类似的使动物中毒情况发生。据报道^[2], 淡水蓝藻中有毒性的藻类主要是下面 7 个属: 鱼腥藻属 (*Anabaena*), 束丝藻属 (*Aphanizomenon*), 膜球藻属 (*Coelosphaerium*), 胶刺藻属 (*Gloeotrichia*), 微囊藻 (*Microcystis*), 节球藻属 (*Nodularia*), 念珠藻属 (*Nostoc*), 其中主要产生毒性的蓝藻是鱼腥藻, 束丝藻和微囊藻属中的某些品系。

蓝藻毒性问题比较系统的研究工作是在最近二十年中进行的。Gorham^[4] 首先在实验室中分离和培养成功微囊藻毒性品系, 该品系被命名为 NRC-1。微囊藻毒素有二个组分都是肽类。一种使实验老鼠在一至二小时死亡的微囊藻毒素是一种环状多肽被称为快速死亡因素 (FDF, fast death factor) 对老鼠的最低致死剂量是纯毒素 0.47 毫克/公斤 (体重)。以后他又从加拿大西部萨斯喀彻温省的伯顿湖中分离出有毒的水华鱼腥藻 (*Anabaena flos-aquae*), 他认为这些藻类是引起二条水牛死亡的原因, 从其中分离得到一种毒性品系并且进行实验室培养。这种品系称为 NRC-44-1。Devlin^[3] 测定了鱼腥藻

本工作进行过程中得到黎尚豪教授和卢孝曾副教授的热忱指导特此致谢。

1986 年 2 月 27 日收到。

毒素证明是一种神经毒碱为 166 道尔顿的低分子量毒素, 小鼠的 90% 致死剂量是纯毒素 0.3 毫克/公斤(体重)。

Jakin 首先分离出束丝藻毒素, 他将采集的有毒束丝藻经过冰冻以后, 将冰冻后的藻类粗提物注射到小鼠体内后立刻引起死亡, 束丝藻毒素的性质和贝类毒素 (Saxitoxin) 相似, 化学结构是四氢嘌呤碱 (tetrahydropurine alkaloid)。以后 Shimizu 指出束丝藻毒素是几种贝类毒素的混合物, 四氢嘌呤碱是其中的一种。

对蓝藻水华毒性的生物监测, 目前国外主要采用两种方法: 1) 血凝法, Carmichael^[2] 认为铜绿微囊藻产生的毒素是分子量 500—1700 道尔顿的肽类, 动物中毒后的组织病理学检查时, 能看到肝脏充血和红血球聚集在肝小叶门静脉中。这种情况和外源凝集素作用相似, 外源凝集素的作用是凝集细胞, 特别对红血球凝集作用更明显。因此他认为采用红血球凝集方法来监测蓝藻毒素是一个有效的方法; 2) 小白鼠腹腔注射粗提物是一种常规的测试动物中毒的手段, 测试结果表明, 凡是对兔、鼠、人的红血球有强凝集作用者, 动物试验时均能出现毒性。我们基于以上的情况开展了对武汉东湖蓝藻水华毒性的研究。

材料和方法

材料来源 取自本所藻种保藏室的藻种有: 雪松聚球藻 (*Synechococcus cedrorum* 水生 140), 粘球藻 (*Gloeocapsa* sp. 水生 138), 实球藻 (*Pandorum morum* 水生 31), 铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa* 水生 172), 钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis* 水生 207), 上述藻类用 2.5 升培养瓶置于 25±1℃ 的恒温水箱中培养 25—30 天。光照强度 3,000lx。培养过程中通入过滤空气。培养后的藻类悬液经 3500 转/分离心沉淀, 浓缩的藻类放在液氮中冷冻保存备用。

水华藻类收集于武汉东湖边, 我们从 84 年春当东湖岸边出现少量蓝藻水华时, 开始定期在岸边用 25 号浮游植物网采集藻类, 带回实验室除去植物碎屑以及其他杂物后, 进得显微镜检查确定藻类主要种属。以后将蓝藻浓缩液倾入一升容量的长圆柱形的浮游生物沉淀器中静置二小时, 藻类就全部密集上浮成一厚层, 然后取出浓藻浆, 弃去清水及沉淀物。浓藻浆用少许蒸馏水冲洗二次后经 3,500—4,000 转/分离心 20 分钟吸出上清液。浓缩的藻浆置于聚乙烯有盖试管中并放入液氮中冷冻保存备用。

血凝法具体步骤 1) 红血球悬浮液的制备。血液取自 25—30 克体重的健康小白鼠。取血前停食一天, 取血时先用氯仿轻度麻醉后用玻璃毛细吸管从眼底部取血。正常情况下一只小白鼠一次可以取血 0.1 至 0.2 毫升。取出血液立即放入 0.9% 氯化钠溶液 (生理盐水) 中, 用生理盐水洗涤 3 次, 每次洗涤时充分搅匀后低速离心 5 分钟以除去血块等物而获得均匀的红血球细胞, 为了防止血液凝集, 要加入保护剂 5% 枸橼酸钠 (血: 枸橼酸钠=4:1) 或者加少量肝素。试验开始前吸取 0.1 毫升浓血球悬液, 用生理盐水稀释成 10 毫升红血球悬浮液, 即 1% 浓度¹⁾。

1) 光密度 O. D. 492nm = 1.5。

藻类粗提液的制备 将已浓缩而贮存于液氮中的藻类取出,逐步转入室温解冻后,用少量生理盐水充分搅匀(此时大部分藻细胞均已破碎,色素蛋白及细胞内含物多半在溶液中),经3,500转/分离心20分钟后吸取上清液即为藻类粗提液。将粗提液用生理盐水配成1:1, 1:2, 1:4, 1:10等不同浓度的溶液。然后用生理盐水作对照(包括阴性和阳性对照)。在96孔V形血凝板上进行测定。不同浓度的藻类粗提液和1%红血球悬浮液各100微升加入一个小孔中,待各稀释度及血球加完后,在室温条件下静置2小时,反应完成,记录血凝作用的强弱程度。每次测定用生理盐水作对照。

小白鼠毒性试验方法 取25—30克体重的健康小白鼠,从腹腔中线一侧注射入200微升经过0.45微米超滤膜过滤的藻类粗提液。注射后在4小时内观察中毒及死亡情况,并解剖观察脏器的肉眼变化。对照组小白鼠注射200微升生理盐水(即每个对照的小白鼠注射0.2毫升生理盐水)。

结 果

(一) 血凝结果 我们选择了5种常见的,室内培养的实球藻,铜绿微囊藻,胶球藻,雪松聚球藻以及螺旋藻进行血凝反应的测试,发现除螺旋藻外均有血凝反应(表1)。同时我们对东湖的蓝藻水华定期采样并进行测定,发现大多数蓝藻水华如铜绿微囊藻,颤藻

表1 室内培养藻类粗提液的血凝作用*
Tab. 1 Hemagglutination results of the crude extracts from the cultures of algae

种 类	光 密 度 O. D. 650μm	稀释比例及反应强度			
		dilution and response			
		1:1	1:2	1:4	1:10
<i>Pandorina morum</i>	1.0	++++	++++	+++	+
<i>Synechococcus cedrorum</i>	1.0	++++	++++	++	+
<i>Microcystis aeruginosa</i>	1.25	++++	++++	++	+
<i>Gloccapsa</i> sp.	0.8	++++	++++	++	+
<i>Spirulina platensis</i> **	1.0	—	—	—	—
Saline control	—	—	—	—	—

注: +表示有血凝作用;++,+++, +++表示血凝作用逐步变强;—表示没有血凝作用。

** 据文献报道 *S. platensis* 系无毒性藻类。

等都有较强的血凝反应,但占四月份蓝藻水华总数80%的卷曲鱼腥藻却无血凝反应。只有当水华中含有25%的水华束丝藻而藻类总浓度达30—60毫克/毫升时才有反应(表2)。

表2 东湖蓝藻水华粗提物血凝作用结果

Tab. 2 Hemagglutination results of the crude extracts from the water bloom in the Donghu Lake

日期 Date	藻类名称 Species of algae	藻类组成百分率% Bloom composition	血球凝集反应结果 Hemagglutination results						藻浓度(毫克/0.1毫升) Conc. (mg/0.1ml)		
			藻浓度 Conc.	血凝结果 result	藻浓度 Conc.	血凝结果 result	藻浓度 Conc.	血凝结果 result	藻浓度 Conc.	血凝结果 result	小鼠毒性反应 Toxicity
4.13	<i>Anabaena circinalis</i> <i>A. variabilis</i> <i>A. spiroides</i>	80 15 5	1.24	—	0.62	—	0.31	—	0.12	—	ND
4.26	<i>A. circinalis</i> <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> <i>A. spiroides</i>	70 25 5	6.0	++	3.0	++	1.5	+-	0.6	+-	—
5.9	<i>Microcystis aeruginosa</i>	100	2.4	+	1.2	+	0.6	+	0.24	+	ND
6.22	<i>M. icrocystis aeruginosa</i>	100	1.2	++	0.6	++	0.3	—	0.12	—	—
7.4	<i>M. icrocystis aeruginosa</i>	100	2.0	++++	1.0	+++	0.5	—	0.2	—	—
7.20	<i>M. icrocystis aeruginosa</i>	100	3.3	++++	1.65	++++	0.82	+++	0.33	—	ND
7.25	<i>M. icrocystis aeruginosa</i> <i>Anabaena Oscillatoria</i>	90 10	2.1	++++	1.05	+++	0.52	+	0.21	+	ND
8.2	<i>Oscillatoria</i>	100	6.8	++++	3.4	++++	1.70	++++	0.68	+-	—
8.4	<i>M. icrocystis aeruginosa</i>	100	3.3	++	1.65	++	0.82	++	0.33	+	ND
8.16	<i>M. icrocystis aeruginosa</i> <i>Melosira Oscillatoria</i> <i>Aphanizomenon</i>	90	4.3	++++	2.15	++++	1.07	++	0.43	+	—
8.27	<i>M. icrocystis aeruginosa</i>	100	2.8	++	1.4	+					+
9.7	<i>M. icrocystis aeruginosa</i>	100	4.4	++++	2.2	++++	1.1	++	0.44	++++	ND
9.11	<i>M. icrocystis aeruginosa</i>	100	1.6	+++	0.8	++	0.4	++	0.16	+	ND
9.17	<i>M. icrocystis aeruginosa</i>	100	2.4	+++	1.2	++	0.6	+	0.24	—	+
9.22	<i>M. icrocystis aeruginosa</i>	100	4.2	++++	2.1	++	1.05	—	0.42	—	+
9.24	<i>M. icrocystis aeruginosa</i>	100	4.1	++++	2.05	++++	1.02	++++	0.41	++++	+
10.18	<i>M. icrocystis aeruginosa</i>	100	4.2 2.0	++++ ++++	2.1 1.0	++++ ++++	0.5	++++	0.2	++	+

注：“+”=有血球凝集作用 “—”=没有血球凝集作用 ND = 未进行小鼠毒性试验。

(二) 生物测试结果 将 14 批藻类粗提液分别注射小白鼠, 发现有 6 批藻类能使小白鼠致死。注射藻类粗提液 10—15 分钟后小白鼠开始有不安而转入昏睡现象, 并伴有抽搐, 最后在 1—2 小时内死亡, 解剖小白鼠体时发现肝脏充血肿大。毒性最强的一批是 10 月 17 日及 10 月 18 日的蓝藻水华样品。其余 8 批中有些有血凝反应, 但无急性中毒现象, 如实球藻, 雪松聚球藻等。螺旋藻既无血凝反应又无小白鼠急性中毒症状(表 3)。

表 3 各种藻类粗提液对小白鼠的毒性作用
Tab. 3 Toxicity of different blooms on mice

日期 Date	种类 Species of algae	藻悬液浓度 (毫克/毫升) Conc. of algae suspension (mg/ml)	注射量 (毫克) Amount injected (mg)	试验小鼠数 Mice tested	死亡率 Mortality
3.1	<i>Spirulina platensis</i> *	20	4.0	4	0
4.26	<i>Anabaena circinalis</i>	60	12.0	4	0
6.22	<i>M. irocystis aeruginosa</i>	12	2.4	4	0
7.4	<i>M. irocystis aeruginosa</i>	20	4.0	5	0
8.2	<i>Oscillatoria</i> sp.	20	4.0	5	0
8.16	<i>M. irocystis aeruginosa</i>	32	6.4	4	0
8.27	<i>M. irocystis aeruginosa</i>	49	9.8	5	5
9.17	<i>M. irocystis aeruginosa</i>	24	4.8	5	5
9.22	<i>M. irocystis aeruginosa</i>	42	8.4	4	4
9.24	<i>M. irocystis aeruginosa</i>	41	8.2	4	4
10.17	<i>M. irocystis aeruginosa</i>	42	8.4	10	10
10.18	<i>M. irocystis aeruginosa</i>	20	4.0	6	6
11.27	<i>Pandorina morum</i> *	28	5.6	5	0
11.27	<i>M. irocystis aeruginosa</i> *	31	6.2	5	0

* 人工培养藻类。

讨 论

蓝藻水华在一些富营养性湖泊中是很常见的, 武汉东湖处于湿热地带, 营养物质丰富, 属强富营养化湖泊, 因此每年水华持续时间往往长达七个月, 即从四月下旬到十一月上旬。根据历年来的资料, 水华中主要的种类为铜绿微囊藻, 卷曲鱼腥藻, 水华鱼腥藻, 水华束丝藻和美丽颤藻。1984 年四月份蓝藻水华种类主要是卷曲鱼腥藻, 五月份以后一直到十一月份都以铜绿微囊藻为主体。八月份夹有一个短期的美丽颤藻水华, 但很快就被微囊藻所替代。根据国外的资料, 常见的毒水华也是以这些藻类为主, 因此武汉东湖的水华是否有毒, 作为饮用水源是否有影响, 是一个值得深入研究的问题。

一般鉴别水华毒性的方法有两种; 一为血凝法, 一为小白鼠生物测试法。从我们实验的结果分析, 大部分水华均有血凝反应, 而八、九、十月份水华现存量最大, 血凝反应也较强。根据 Carmichael^[2] 的报道: 他认为有血凝反应的都有毒性, 我们的结果与此有相似之处, 即凡对小白鼠有急性致死反应的均有血凝, 但是也有一些结果和此规律不一致, 如美丽颤藻, 及实验室培养的实球藻, 微囊藻虽然均有较强的血凝反应, 但对小白鼠却无急

性致死的效应, 10月18日的铜绿微囊藻只有以上藻类粗提液一半的浓度就已可使小白鼠中毒死亡。因此我们认为血凝法应与小白鼠生物测试并行检测, 或找出另一种快速而可靠的测试毒性方法。

我们测试的东湖蓝藻水华材料中有6批铜绿微囊藻对小白鼠有毒性, 其中毒症状及解剖学观察均和国外的报道相同。我们认为是肝毒素引起的, 最为明显的是肝脏肿大充血。1980年渡边^[8]研究了日本富营养化型湖泊中微囊藻毒素对小白鼠的最低致死量为50毫克/毫升(指藻类粗提液中藻类的干重量)。我们测试的浓度为10—60毫克/毫升, 一般为40毫克/毫升, 最低致死量为10毫克/毫升。Gorham及Carmichael(1980)^[1,4]认为微囊藻产生的毒素有两类, 一种为快死因素能使小白鼠在1—2小时内死亡, 另一种为4—48小时死亡的慢致死因素(其中包括细菌的影响)。根据我们的实验结果可以认为东湖8—10三个月这个时期的微囊藻毒素是属于快死因素。我们将这类能使小白鼠致死的藻类粗提物经葡聚糖凝胶进行粗分离, 其淡黄色的一峰有毒性, 用它注射小白鼠其症状及死亡的时间均类似于文献中报道的多肽类毒素(详情另文发表)^[1]。一般认为多肽类的微囊藻毒素较为复杂, 目前已报道的有5种, 武汉东湖中铜绿微囊藻的毒性属于何种尚须进一步分析, 但至今为止尚未见水鸟, 家畜或鱼类的死亡与蓝藻水华直接相关的报道。

不是所有的蓝藻水华都有毒性, 东湖从五月份开始水华就以微囊藻为主, 但小白鼠无急性中毒反应, 八月底开始一直到十月中旬所测试的材料均有急性致毒的效应, 究竟是何因素导致原来无毒的水华变为有毒水华现在尚不清楚。1984年东湖六月中旬开始到八月中旬有两个月的水温持续维持在 $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 总辐射量较高, pH9—10, 此时由于风力作用, 使大量蓝藻聚集于湖岸, 厚度达4—5厘米。这些因素是否能造成毒水华的形成尚待进一步验证。

参 考 文 献

- [1] Carmichael, W. W. and P. R. Gorham, 1980. Freshwater Cyanophyte toxins: Types and their effects on the use of micro-algae Biomass. In "Algae Biomass" p. 437—448. Ed. by C. J. Soeder. Elsevier/Northeast-Holland Biomedical press.
- [2] Carmichael, W. W., 1981. Hemagglutination method for Detection of Freshwater Cyanobacteria (Blue-green algae) Toxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(6): 1383—1388.
- [3] Devlin, J. P., D. E. Edwards, and P. R. Gorham. 1977. Anatoxin-a, a toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae* NRC-44-1. *Can. J. Chem.*, 55: 1367—1371.
- [4] Gorham, P. R. 1960. Toxin waterblooms of Blue-green algae. *Can. Vet. J.*, 1: 235—245.
- [5] Gorham, P. R., 1964. Toxic algae. In "Algae and Man" p. 307—336 Ed. by D. F. Jackson, plenum Press.
- [6] Moore, R. E., 1977. Toxins from Blue-green Algae. *Bioscience*, 27: 797—802.
- [7] Schwimmer, D. and M. Schwimmer., 1968. Medical Aspects of Phycology. In "Algae, Man and the Environment," p. 279—358. Ed. by D. F. Jackson, Syracuse Univ. Press.
- [8] Mariyo, F. Watanabe and Shinshi Oishi 1980. Toxicities of *Microcystis aeruginosa* collected from some lakes, reservoirs, ponds and moat in Tokyo and adjacent regions *Jap. J. Limnol.*, 41. 1. 5—9.

1) 何家莞, 东湖蓝藻水华毒性的研究(二)蓝藻水华毒素的分离与鉴定(待发表)。

STUDY ON THE TOXICITY OF WATER BLOOM IN THE DONGHU LAKE WUHAN 1. DETECTION OF THE TOXIC EFFECT OF BLUE-GREEN ALGAE

Yu Jialu, Chen Minghui, Lin Kuner and Yu Minjuan

(Institute of Hydrobiology Academia Sinica, Wuhan)

Abstract

In recent years, due to the eutrophication of water-bodies, some lakes and reservoirs that serve as the sources for water supply have been heavily contaminated by water bloom. It was demonstrated abroad that some species of the blue-green algae produce toxic substances having harmful effects on domestic animals. Those blue-green algae reported to produce toxic substances are also found in lakes in our country. Therefore, it is important to clarify whether they are really toxic or not.

So far as we know, this study is the first one using hemagglutination test and mouse assay method to detect the toxicity of blue-green algae in China. The samples of water bloom collected from the Donghu Lake from late August to mid October in 1984 were examined. Six out of fourteen samples showed toxicity to experimental animals. The dominant species of the bloom was *Microcystis aeruginosa*.

Key words Blue-green algae water bloom, toxicity, hemagglutination test