第 28 卷 第 2 期 水 生 生 物 学 报 Vol. 28, No. 2
2 0 0 4 年 3 月 ACTA HYDROBIOLOGICA SINICA Mar., 2004

微囊藻毒素在沉水植物苦草中的积累

尹黎燕[1] 黄家权[2] 沈 强[1] 李敦海[1] 刘永定[1]
(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 华中农业大学, 武汉 430070)

摘要: 研究了微囊藻毒素 RR 在大型沉水植物苦草根、叶组织中的积累作用, 通过 ELISA 方法检测发现, 苦草可以吸收 MC-RR, 其吸收具有时间和剂量效应, 根的吸收作用强于叶。第 7d 叶对 MC-RR 的吸收已经达到平衡, 而根对 MC-RR 的吸收在处理第 16d 时还在上升。苦草根和叶对 MC-RR 的最大吸收量分别可达到 14.83±0.12μg/g. FW 和 0.32±0.026μg/g. FW。在 0.0001mg/L 的低浓度下, 苦草根和叶对 MC-RR 的吸收量分别为 0.59±0.083μg/g. FW 和 0.28±0.016μg/g. FW, 生物浓缩系数分别为 5.85±0.83 和 2.85±0.16。这个结果表明, MC-RR 可以在苦草中积累并有可能转移到食物链中。

关键词: 苦草; 微囊藻毒素; 积累
中图分类号: X173 文献标识码: A 文献编号: 1000-3207(2004)02-0151-04

湖泊富营养化和蓝藻水华暴发引起的环境和人类健康问题正受到世界各国的高度重视[1—3]。众所周知, 很多水华蓝藻可以产生大量的有毒次生代谢物质, 如肽(肝毒素), 生物碱(神经毒素)和脂多糖(皮炎毒素)等, 微囊藻毒素(MC)是最主要的一种。微囊藻毒素是结构为环状七肽的小分子, 进入生物体内对蛋白磷酸酶 1 和 2A 起抑制作用[4—5]。大量的研究主要集中于微囊藻毒素对动物作用及其机理[6—9]。有研究表明, 微囊藻毒素可以在浮游生物[10], 水生无脊椎动物[11]和鱼体[12]中积累, 并有可能通过食物链威胁到人类健康。

有关微囊藻毒素对植物的研究相对较少, 并且主要集中于微囊藻毒素对陆生植物或幼苗生长和酶活性的影响[13—14]。Kurki-Helasmo 和 Meriluoto[15] 报道了 *Sinapis alba* L. 幼苗可以吸收约 80ng/mg 植物蛋白的 MC-RR。水生植物作为初级生产者, 在水生态系统中起着重要的作用。水生植物直接与环境中的 MC 接触, 有可能积累 MC 并通过动物的摄取等进入食物链。Pflugmacher[17] 报道了 MC 在几种水生植物中的积累, 挺水植物芦苇可以吸收并代谢 MC。

很多水生植物是鱼、鸟和蟹的食物。我国一些水产养殖区域, 水生植物被用来作为鱼、蟹等的饵料或栖息地。在越来越多的湖泊富营养化并暴发蓝藻水华的情况下蓝藻水华通过光照竞争、营养竞争等引起了大型水生植物生物多样性的下降。同时, MC 有可能在水生植物中积累, 一方面可能引起水生植物生长发育方面的响应, 另一方面, MC 有可能通过水生植物的被摄取而转移到食物链中, 威胁到人类的健康。

在富营养化和水华蓝藻成灾的高原湖泊滇池, 微囊藻是水华蓝藻的优势属, 它们产生的微囊藻毒素主要为 MC-RR, 其浓度超过 1μg/L。本文以我国常见的大型沉水植物苦草为材料研究了不同时间和不同 MC-RR 浓度处理下, MC-RR 在苦草根和叶中的分布, 并且使用了与滇池相接近的 MC-RR 浓度处理, 以了解在自然水体条件下, MC-RR 在大型水生植物中的生物积累作用。

1 材料和方法

1.1 MC-RR 的制备 取适量的滇池微囊藻水华干藻粉, 用 5% 的醋酸搅拌抽提 2h, 25 目的浮游生物网过滤。滤渣加 5% 醋酸再抽提 2h, 合并滤液, 7000r/min 离心 15min。上清液过 Sep-Pak C18 柱, 甲醇洗脱液蒸干, 水溶解。经 HPLC 检测, 上述方法制备的 MC-RR

收稿日期: 2003-11-17; 修订日期: 2003-12-12
基金项目: 中国科学院知识创新工程重大项目(KZCX1-SW-12), 国家重大环境课题"滇池蓝藻水华污染控制技术研究"(K99-05-35-01)、973 项目(2002CB412300)和中国科学院方向性创新课题(220316)资助
作者简介: 尹黎燕(1976—), 女, 浙江嵊州人; 博士生; 从事藻类生理生态方面的研究, lyyin@ihb.ac.cn
通讯作者: 刘永定 liuyd@ihb.ac.cn

纯度为76.8%。

1.2 植物材料 苦草[*Vallisneria natans*(Lour.) Hara.]种子由中国科学院武汉植物研究所水生植物生物学实验室提供。种子用自来水冲洗30min,超净工作台上用70%酒精处理30s后再用2%NaClO 8min表面消毒,无菌水洗3—4次后接种于BG11液体培养基,培养条件为16h光照8h黑暗,光强40μE·m^{-2}·s^{-1},温度25℃培养两个月后,用毒素处理。

1.3 MC-RR对苦草幼苗的暴露实验 BG11培养基中加入经抽滤灭菌的MC-RR,使其终浓度分别为0.0001,0.01,0.1,10mg/L。大约1g鲜重(FW)的苦草幼苗浸入80mL的MC-RR溶液中,7d后测量苦草中MC-RR的含量。另取约1g FW的苦草幼苗于80mL 10mg/L的MC-RR溶液中,分别在处理的第1d,3d,7d和16d取样测量苦草中MC-RR的含量。所有的实验都重复3次。

1.4 苦草中MC-RR的提取和检测 MC-RR处理后的苦草植株用蒸馏水洗涤4次,以除去表面的MC-RR,然后用滤纸吸干表面水分。根和叶分别称重后,加入液氮碾磨成粉,用5%醋酸和90%甲醇分别提取一次,甲醇提取液离心蒸干后与醋酸提取液混合过Sep-Pak C18柱,再蒸干,用水定容,ELISA试剂盒(Envirologix microcystin plate kit, 500 Riverside Industrial Parkway Portland, Maine USA 04103)检测MC-RR的含量。

2 结果

2.1 不同MC-RR浓度下,苦草对MC-RR的吸收

苦草对MC-RR的吸收量随着MC-RR浓度的上升而增加(图1)。在10mg/L的浓度下,苦草根和叶对MC-RR的吸收量分别可达到1.31±0.12μg/g.FW和0.35±0.095μg/g.FW,在0.0001mg/L的低浓度下,苦草根和叶对MC-RR的吸收量分别只有0.59±0.083pg/g.FW和0.28±0.016pg/g.FW。然而,苦草对MC-RR的生物浓缩系数(BCF)却随着MC-RR浓度的上升而降低(图1)。在10mg/L的浓度下,苦草根和叶对MC-RR的BCF值只有0.13±0.013和0.035±0.0048,而在0.0001mg/L的低浓度下,苦草根和叶对MC-RR的BCF值分别达到了5.85±0.83和2.85±0.16。

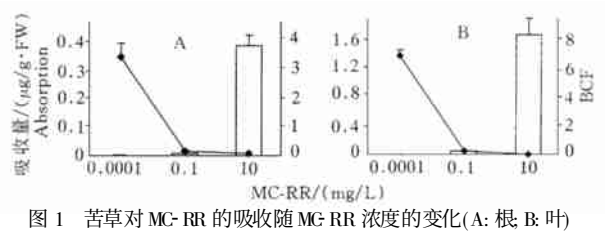

图1 苦草对MC-RR的吸收随MC-RR浓度的变化(A:根;B:叶)

Fig.1 Uptake of microcystin-RR in V. *natans* plant after 7d exposure. (A: root; B: leaf)

□ Absorption —®— BCF

2.2 苦草对MC-RR的吸收动力学

苦草暴露于10mg/L MC-RR溶液中,其根在1d时对MC-RR的吸收量较少,为0.43±0.0023μg/g.FW,随后成倍增长,7d后急剧上升(图2)。16d时,根对MC-RR的吸收量占了所使用MC-RR的1.26±0.039%,也就是14.83±0.12μg/g.FW。苦草叶在1d内对MC-RR的吸收量为0.18±0.015μg/g.FW,随后缓慢上升,7d吸收就达到了平衡。16d吸收量略有下降(图2)。

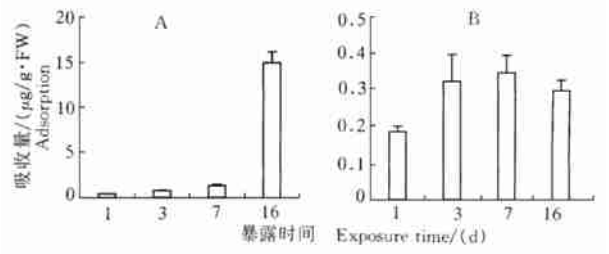

图2 苦草对MC-RR的吸收随时间的变化(A:根;B:叶)

Fig.2 Time-dependent uptake of MC-RR in V. *natans* plant. (A: root; B: leaf)

3 讨论

从微囊藻毒素暴露实验可知,MC-RR可以被大型沉水植物苦草吸收。根对MC-RR的吸收量在第1d时约是叶的2倍,16d约是叶的40倍(图2)。这与*Elodea canadensis*(伊乐藻)对MC-LR的吸收有所不同,*E. canadensis*的叶对MC-LR的吸收大于根[16],这可能是由于不同的植物根和叶的吸收能力和代谢能力不同。10mg/L MC-RR处理7d后,苦草根和叶对MC-RR的吸收量分别可达到1.31±0.12μg/g.FW和0.35±0.095μg/g.FW,约是*E. Canadensis*对MC-LR吸收量的1/100[16]。然而,在0.0001mg/L的低浓度下处理7d,苦草根和叶对MC-RR的吸收量虽然分别只有0.59±0.083ng/g.FW和0.28±0.016ng/g.FW,却是芦苇(*Phragmites australis*)球根和叶在0.0005mg/L MC-LR相同处理时间下吸收量的10倍[17]。比表面积越大,对有机污染物的生物富集能力越强[18]。苦草对MC的吸收能力小于伊乐藻而大于芦苇,一个原因是不同的植物吸收能力不同,另一个原因可能就是苦草比表面积大于伊乐藻而小于芦苇。

有机物在第一营养级的积累系数是随着有机物的不同而不同的, 王修林[19]研究了 5 种海洋浮游植物对 4 种氯代苯的 BCF 值为 12 到 2669 不等。在 0.0001mg/L 的 MC-RR 浓度下, 苦草根和叶对 MC-RR 的 BCF 值比较低, 分别为 5.85±0.83 和 2.85±0.16, 但却是芦苇球根和叶在 0.0005mg/L MC-LR 相同处理时间下的 50 倍[17]。这说明可能是 MC-RR 本身的性质导致了 BCF 值低。但是, 由于苦草处于食物链中的第一营养级, MC-RR 的积累可以通过食物链逐级放大, MC-RR 对环境污染的生态风险不容忽视。

滇池湖区 MC-RR 的浓度常年高于 0.0001mg/L, 从本实验的结果可以推断, 滇池及其它类似湖泊中的 MC-RR 可以在苦草中积累并有可能转移到食物链中。近几十年来, 由于蓝藻水华暴发, 滇池水生植物退化非常严重, 尤其是苦草已经几乎灭绝。有关 MC 对大型水生植物生长发育的影响未见报道。MC 是否通过他感作用影响了水生植物的生长呢? 这有待于进一步的研究。

参考文献:

[1] Harada K, Oshikata M, Uchida H, *et al*. Detection and identification of microcystins in the drinking water of Haimen City, China [J]. *Nat. Toxins*, 1996, **4**: 277—283

[2] Pilotto L S, Douglas R M, Burch M D *et al*. Health effects of recreational exposure to cyanobacteria (blue-green algae) during recreational water-related activities [J]. *Aust. N. Z. J. Public Health*, 1997, **21**: 562—566

[3] Carmichael W W, Falconer I R. Algal toxins in Seafood and Drinking Water [M]. London: Academic Press. 1993, 187—209

[4] MacKintosh C, Beattie K A, Klumpp S, *et al*. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants [J]. *FEBS Letters*, 1990, **264**: 187—192

[5] Chen J P, Xu L H, Zhang Y Y. A study of inhibition of Microcystins on protein phosphatase in fish tissue homogenate [J]. *Acta Hydrobiol Sini*, 1998, **22**(1): 95—97[陈加平, 徐立红, 张甬元。微囊藻毒素对鱼组织匀浆液蛋白磷酸酶活性抑制作用的研究. 水生生物学报 1998, **22**(1): 95—97]

[6] Dawson R M. The toxicology of microcystins [J]. *Toxicon*, 1998, **36**: 953—962

[7] Yoshida T, Makita Y, Nagata S, *et al*. Acute oral toxicity of microcystin-LR. a cyanobacterial hepatotoxin, in mice [J]. *Nat. Toxins*, 1997, **5**: 91—95

[8] Li X Y, Liu Y D, Song L R, *et al*. Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR [J]. *Toxicon*, 2003, **42**: 85—89

[9] Zhou B S, Xu L H, Zhang Y Y. The effect of microcystin-LR on the liver ultrastructure of grass carp, *ctenopharyngodon idellus* [J]. *Acta Hydrobiol Sini*, 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]

[10] Ferrão Filho ADS, Kozlowsky-Suzuki B, Azevedo SMFO. Accumulation of microcystins by a tropical zooplankton community [J]. *Aquat. Toxicol*, 2002, **59**: 201—208

[11] Mohamed Z A. Accumulation of Cyanobacterial Hepatotoxins by Daphniain in Some Egyptian Irrigation Canals [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2001, **50**: 4—8

[12] Malbrouck C, Trausch G, Devos P *et al*. Hepatic accumulation and effect of microcystin-LR on juvenile goldfish *Carassius auratus* L. [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2003. Part C: 1—10

[13] Mórta M, Csaba M, Erika M, *et al*. Microcystin-LR alters the growth, anthocyanin content and single-stranded DNase enzyme activities in *Sinapis alba* L. seedlings [J]. *Aquatic Toxicology* 2003. **62**: 1—9

[14] McElhiney J, Lawton L A, Leifert C. Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure [J]. *Toxicon*. 2001, **39**: 1411—1420

[15] Kurki-Helasmo K, Meriluoto J. Microcystin uptake inhibits growth and protein phosphatase activity in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings [J]. *Toxicon*, 1998, **36**: 1921—1926

[16] Pflugmacher S, Wiegland C, Beattie K A *et al*. Uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR by aquatic macrophytes [J]. *J. Appl. Bot*, 1998, **72**. 228—232

[17] Pflugmacher S, Wiegland C, Beattie K A *et al*. Uptake, effects, and metabolism of cyanobacterial toxins in the emergent reed plant [J]. *Phragmites australis* (Cav.) *Trin. ex Steud*. *Environ. Toxicol. Chem*, 2001, **20**: 846—852

[18] Gobas F A. Bioconcentration of chlorinated aromatic hydrocarbons in aquatic macrophytes [J] *Environ Sci Tech*, 1991, **25**: 924—929

[19] Wand X L, Ma T, Yu W J. Two-Compartment thermodynamic model for the bioconcentration of hydrophobic organic chemicals by marine phytopankton [J]. *J. of Ocean university of Qingdao* 1998, **28**(2): 299—306[王修林, 马廷军, 郁伟军。海洋浮游植物的生物富集热力学模型—对疏水性污染有机物生物富集双箱热力学模型[J]. 青岛海洋大学学报, 1998, **28**(2): 299—306]

UPTAKE OF THE CYANOBACTERIAL HEPATOTOXIN MICROCYSTIN-RR BY SUBMERGENT MACROPHYTE *VALLISNERIA NATANS* (LOUR.) HARA.

YIN Li-Yan[1], HUANG Jia-Quan[2], SHEN Qiang[1], LI Dun-Hai[1] and LIU Yong-Ding[1]

(1. *Institute of hydrobiology, The Chinese Academy of Science, Wuhan* 430072

2. *Huazhong Agriculture university, Wuhan* 430070)

Abstract: Recently, heavy blooms frequently occured in Dianchi Lake and *Microcystis* is the main algae involved in blooms. *Microcystis* produces a family of related cyclic hepatopeptides (microcystins, MC). These toxins are severely hepatotoxic. Most investigations about the toxicity of the microcystins are focused on animals and terrestrial plants. To our knowledge, only a few studies have been made on the possible accumulation of microcystins on aquatic plants. This Paper evaluated the accumulation of MC-RR in *Vallisneria natans*, which is commonly used as food for fish or crab in some aquaculture places, using ELISA to quantify the amount of the heptotoxin accumulated. The results indicated that the roots and leaves of *V. natans* seedlings can absorb MC-RR. the amount of toxin accumulated in the roots and leaves of the seedlings is time and dose dependent, and the roots absorbed more toxins than leaves given the same condition. The absorption peaked after 7d's exposure to the toxin and maintained this value in leaves, while the toxin in roots still accumulating after 16d's exposure. The maximum amount of toxin accumulated in the roots and leaves is 14.83 ±0.12μg/g. FW and 0.32 ±0.026μg/g. FW respectively when exposed to the 10mg/L toxin solutions, and the numbers reduced to 0.59 ±0.083pg/g. FW and 0.28±0.016pg/g. FW when the toxin is at the concentration of 0.0001 mg/L. In contrast, the BCF value of the root and shoot increased from 0.13 ±0.013 and 0.035 ±0.0048 to 5.85±0.83 and 2.85 ±0.16 respectively. The results indicate that Microcystin-RR can accumulate in *Vallisneria natans* plant and raise the possibility that Microcystins could be thereby transferred into aquatic food web.

Key words: *Vallisneria natans* (Lour.) Hara; MC-RR; uptake