

水库微囊藻毒素 3 种异构体的年变化过程研究

蔡金榜¹, 李文奇², 逢 勇³, 赵 伟³

(1.环境保护部南京环境科学研究所, 南京 210042; 2.中国水利水电科学研究院水环境研究所, 北京 100038; 3.河海大学 环境科学与工程学院, 南京 210098)

摘 要:应用高效液相色谱,对华北地区某水库 5 个采样点水体中微囊藻毒素(MC-LR、RR 和 YR)3 种异构体进行了为期 1 a 的监测,研究 3 种异构体随时间的变化规律及相互关系。结果表明,水体中 3 种异构体(-LR、YR 和 RR)含量分别为 0.941 ± 1.338 、 0.365 ± 0.647 和 $(2.893 \pm 5.387) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 3 种异构体出现时间不一样,LR 异构体出现时间最早,在 4 月下旬即可检测到,而 RR 和 YR 异构体则需到 5 月中旬才能检测到; 3 种异构体峰值出现时间也不一致,LR 和 YR 异构体峰值出现在 8—9 月,而 RR 异构体出现时间较晚,到 10—11 月才达到全年最高值;LR 和 RR 异构体的含量比较高,是主要毒素,5—11 月,其比值由 2.20 降到 0.04,这与水体中的 N/P 比值有关,它随 N/P 比值的减少而减少。

关键词:水库;微囊藻毒素;异构体;N/P 比值

中图分类号:X172 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2010)01-0152-05

Annual Variations of Three Isomers of Microcystins in a Reservoir

CAI Jin-bang¹, LI Wen-qi², PANG Yong³, ZHAO Wei³

(1.Nanjing Institute of Environmental Science, Ministry of Environmental Protection of China, Nanjing 210042, China; 2.Department of Water Environment, IWHR, Beijing 100038, China; 3.College of Environmental Science and Engineering, Hohai University, Nanjing 210098, China)

Abstract: The high performance liquid chromatography (HPLC) was used to monitor three isomers (-LR, -YR, -RR) of microcystins (MCs) within one year in five sampling cites in a reservoir in the northern part of China. The rule of the three isomers changed with time and their relationship were explored. The results were shown as follows: the concentrations of three isomers were 0.941 ± 1.338 , 0.365 ± 0.647 and $2.893 \pm 5.387 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. The first detectable time of three isomers in the reservoir was different. The MC-LR could be detected on late April, but MC-YR and MC-RR was detected until the middle ten days of May. Annual varying regulations of three isomers had many obvious differences and there were obvious fluctuations within one year. Before the middle ten days of August, three isomers contents order was: MC-LR > MC-RR > MC-YR and then the order changed: MC-RR > MC-LR > MC-YR. Their peak contents appeared at different time. The peak contents of MC-YR and MC-LR occurred from August to September, but MC-RR occurred from October to November. The mean proportions of three isomers in total MCs were 32.4%, 8.7% and 58.9%, respectively. So, the MC-LR and MC-RR were the main toxins of MCs, but their proportions to the total concentration of MCs were not fixed and the ratio of MC-LR to MC-RR descended from May to December. The ratio was affected by the rate between nitrogen and phosphate (N/P) and correlated well with N/P.

Keywords: reservoir; microcystin; isomers; N/P

微囊藻毒素(Microcystin, MCs)主要由铜绿微囊藻、节球藻、鱼腥藻、念珠藻和颤藻等产生,是一类具有生物活性的七肽单环肝毒素,分子量约为 1 000,至今已发现了 60 多种同分异构体^[1],在这些毒素中含量

较大的主要有 3 种类型(图 1),分别是 MC-LR、RR 和 YR(L, R, Y 分别代表亮氨酸、精氨酸和酪氨酸),其中 MC-LR 的毒性大于 MC-RR 和 MC-YR^[2]。

MCs 是细胞内毒素,它在细胞内合成,细胞破裂后释放出来并表现出毒性^[3]。动物饮用了含 MCs 的水后,会出现腹泻、厌食、呕吐等症状,甚至死亡^[4]。人类饮用或直接接触藻类污染的水体会引起皮肤反应、腹泻、肠胃炎等症状,长期饮用可能会引发肝癌,医学部门已发现饮水中微量 MCs 与人群中原发性肝癌的发

收稿日期:2009-06-12

基金项目:水利部科技创新项目(SCX2002-04);国家自然科学基金项目(50579015)

作者简介:蔡金榜(1976—),男,福建泉州人,博士,主要从事水污染控制研究。E-mail:jinbangcai@126.com

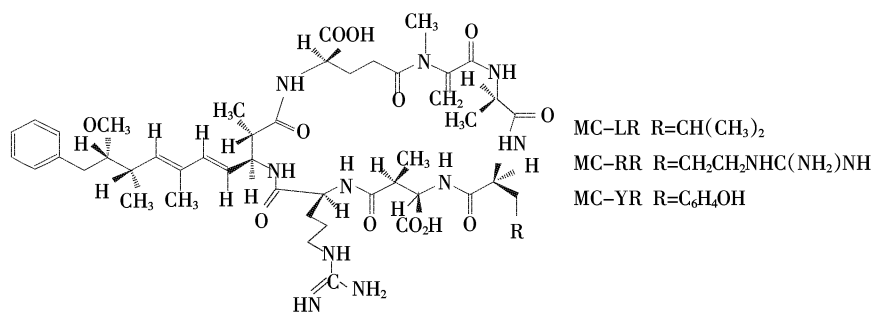


图1 微囊藻毒素3种异构体的结构

Figure 1 Structure of three microcystin isomers

病率有很大相关性^[5]。1996年,在巴西发生了一起严重的医疗事故中,证实了MCs急性中毒的危害,其中60人死亡^[6]。

目前,水体中微囊藻毒素污染已成为一个全球性的环境问题而日益受到人们的关注,已有学者对微囊藻毒素在水体中的变化进行了研究,并取得了一定的研究成果,但是仍然存在一些不足之处:连续观测时间比较短,主要集中在蓝藻水华暴发阶段,不能全面反映微囊藻毒素在水体中的年变化过程^[7-9];部分观测时间比较长,但是均以微囊藻毒素总量为调查单位,无法解释不同异构体的年变化规律及其关系^[10-11]。因为目前已发现的微囊藻毒素异构体达到60多种,而且其毒性也存在明显的差异,所以研究微囊藻毒素3种异构体的年变化过程及其关系具有重要意义。

因此,本文以华北地区某水库为研究对象,对水库5个采样点水体中微囊藻毒素3种异构体(LR、YR、RR)含量进行为期1a的野外观测,研究3种异构体的年变化过程及其关系。

1 材料与方法

1.1 水库基本特征

水库位于华北地区,库容 $1.4 \times 10^8 \text{ m}^3$,平均水面面积 13 km^2 ,平均水深 5.7 m 。近些年来,地表径流带入水库的营养盐不断增多,导致在夏季蓝藻大暴发,水库水体富营养化日益严重,影响了水库的饮用水源功能。目前,水库水体呈“藻型浊水富营养化状态”,水质属IV~V类。

1.2 采样点布设

依据库底地形,水面面积,入库河流和出库口分布,富营养化状况及其主要分布特征等,在水库的四周及水库中心各设1个采样点,即:1号采样点(农业引水口)、2号采样点(西干渠引水口)、3号采样点(西河入库口)、4号采样点(东河入库口)和5号采样点

(水库中心)。

1.3 样品采集

2005年1月至12月,在水库5个采样点利用有机玻璃采样器,距离水面0.5、3和6m处分别取水样2L,并等体积混合。每月采集1~2次,并根据水华现象严重程度,进行了加密采样。

1.4 分析及测量方法

取水样1~5L,经GF/C滤膜($0.45 \mu\text{m}$)过滤后,滤液于 4°C 下避光保存待富集。先后分别用10mL甲醇、Millipore制纯净水20mL冲洗固相萃取柱SPE(Agilent AccuBonD II ODS C₁₈, $500 \text{ mg} \cdot 6 \text{ mL}$)2遍,分别将滤液以 $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 流过经过活化处理的SPE小柱,使目标提取物吸附于SPE柱中。先后用10%甲醇10mL,Millipore制纯净水20mL冲洗SPE柱2遍,流速同上。最后,用80%甲醇5mL冲洗SPE柱,将洗出液收集到K-D瓶中,放入 40°C 恒温水浴中,并用纯净氮气吹至浓缩体积为0.8mL,最后用甲醇定容至1mL,留作HPLC分析用。

MCs检测采用美国安捷伦公司Agilent HPLC1100高效液相色谱仪,配备紫外可见光检测器。检测条件:NOVA-PAK C₁₈色谱柱,波长239nm,柱温 40°C ,进样量 $10 \mu\text{L}$,流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,流动相为甲醇:水(磷酸缓冲盐pH3)=1:1(体积比)。

MCs(RR、YR、LR)标准品由日本筑波大学提供,在 -20°C 冷冻保存备用。

2 结果与讨论

2.1 水库藻类鉴定

近年来,水库均在夏秋季节暴发大面积“水华”,水库藻类鉴定结果表明,水库中生长的藻种分别是蓝藻门、隐藻门、硅藻门和绿藻门等,而水体中优势种主要为微囊藻属,此外,还有鱼腥藻属,念球藻属,粘杆藻属;硅藻门的小环藻属,隐藻门的隐藻属。

2.2 MCs 的测定

图 2 是 MCs 标准样品和从水库水样中提取提纯 MCs 的 HPLC 分析色谱图。图中显示 MCs 标准样品在 HPLC 分析中出峰先后顺序为 MC-RR、MC-YR、MC-LR,其保留时间分别为 7.984、9.795、14.844 min。从水样中提取提纯的 MC-RR、MC-YR、MC-LR 的保留时间分别为 8.132、9.805、14.878 min,与标准样品的保留时间基本一致。同时将 MCs 标准样品和从水样中提取提纯的 MCs 在 200~300 nm 进行了最大紫外吸收扫描,发现两者均在 239 nm 具有最强的吸收峰并且其吸收图谱的形状极为相似,因此可以确认从水库水样中提取提纯的化合物就是 MCs,并根据保留时间确定水样中的 3 种异构体,采用外标法定量。

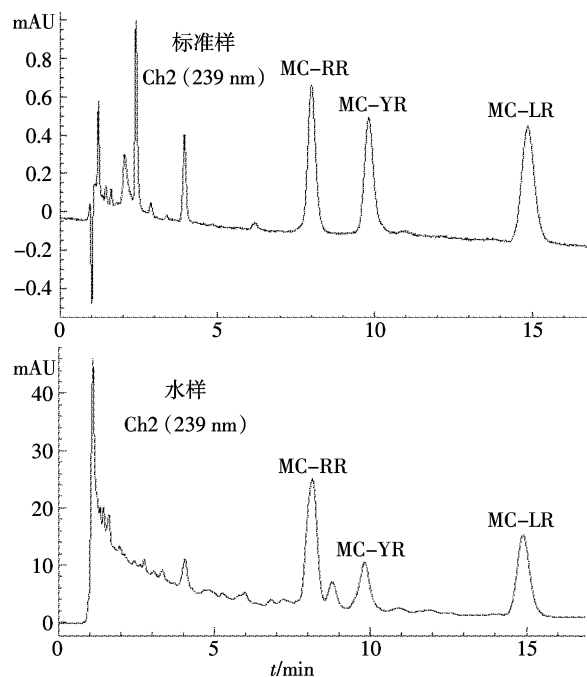


图 2 HPLC 分析色谱图

Figure 2 The chromatogram of MCs in HPLC analysis

2.3 微囊藻毒素 3 种异构体的年变化过程

水库水体中微囊藻毒素 3 种异构体平均含量随时间的变化过程如图 3 所示。

图 3 表明,3 种异构体在水体中检出时间不一致,LR 异构体出现时间最早,在 4 月下旬即可检测到,而 RR 和 YR 异构体则需到 5 月中旬才能检测到;3 种异构体在水体中消失的时间也不相同,其中 RR 和 LR 异构体在 12 月底即可消失,而 YR 异构体到次年 1 月还能检测到;3 种异构体峰值出现时间不一致,YR 和 LR 异构体都在 9 月份出现高峰值,而 RR 异

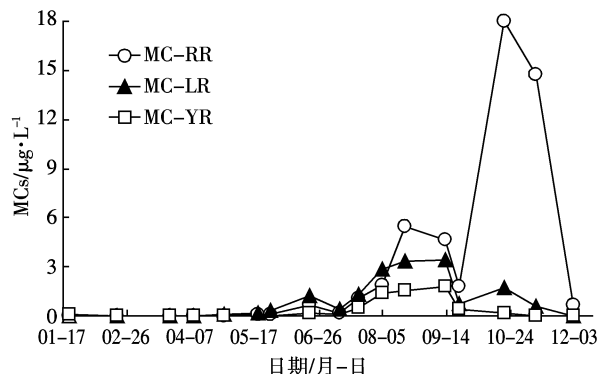


图 3 微囊藻毒素 3 种异构体平均浓度的年变化过程

Figure 3 Annual variety of three isomers in a reservoir

构体出现时间较晚,到 10 月份才达到全年的最大值;在 8 月之前,LR 异构体含量最高,RR 异构体次之,YR 异构体最小;而 8 月之后,RR 异构体含量增加相对较快,成为 3 种异构体中的最高者,异构体 LR 次之,YR 异构体最小;全年 3 种异构体在水体中都呈现出 3 个毒素峰,分别出现在 6 月、8 月或 9 月、10 月,其中 6 月份的毒素峰较小。

3 种异构体含量达到峰值后快速降低(图 3),这是由于微囊藻毒素在自然水体中容易被光和生物降解,尤其以光降解的速率较快,一般认为微囊藻毒素在藻类死亡大量释放后可在自然水体中持续数天到数周,而浅水水体中微囊藻毒素的光降解比深水水体更快^[12],另外水库来水的稀释作用,也可能是水库水体中微囊藻毒素含量在数天内快速降低的原因。3 种异构体含量在 9 月中下旬急剧下降,这可能是与该时期水库的降雨有关,大量的降雨径流进入水库起到稀释作用,从而引起微囊藻毒素含量的降低。此后,随着水温的逐渐降低,藻类不适宜大量生长并开始死亡,藻类死亡分解时释放微囊藻毒素到水体中,造成水体中微囊藻毒素含量升高,并在 10 月份出现一个高峰。

张玮等在实验室条件下研究了环境因子对铜绿微囊藻的生长和微囊藻毒素积累与释放的影响,发现微囊藻细胞内的 LR 异构体含量随着培养时间而逐渐增大,而 RR 异构体含量变化呈现不同特点,在生长后期的含量较高,中间时期的含量较低;释放到细胞外的微囊藻毒素含量也随着培养时间逐渐增加,但是两种毒素释放的速度不一样,LR 异构体释放速度比较快^[13]。本文研究结果也发现 RR 异构体的峰值出现时间相对较晚,明显滞后于 LR 和 YR 异构体,但是其峰值比其他两种异构体高很多。这主要是由于不同异构体在水体中的稳定性不同,而且微囊藻毒素在水

体中的释放还受环境因子的调节,并不是完全依靠藻的分解而释放。

调查期间6—10月,水库水体中LR异构体含量平均值均超过 $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,超过了1998年WHO出版的《饮用水卫生基准》增补版和2001年我国卫生部颁发的《生活饮用水卫生规范》中推荐的饮用水中LR异构体浓度基准值 $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,由此可见该水库对饮用水安全已构成严重威胁。尽管RR和YR异构体的毒性较LR异构体小,而且目前尚无饮水卫生标准,但是其部分检测值也超过 $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,特别是RR异构体,其最大值高达 $22.068 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,故对其危害性也不容忽视。

2.4 微囊藻毒素组成的变化

5—12月,3种异构体均能检出,为此研究3种异构体(LR、YR、RR)含量在微囊藻毒素总量MCs(LR+YR+RR)中所占比例的变化过程,见图4。LR异构体所占的比例从5月份的63.40%逐渐下降到12月份的1.46%,而RR异构体所占比例的变化过程则完全与LR异构体相反,从5月份的28.82%逐步上升到12月份的96.30%,YR异构体所占的比例最小,其平均值仅为8.73%。

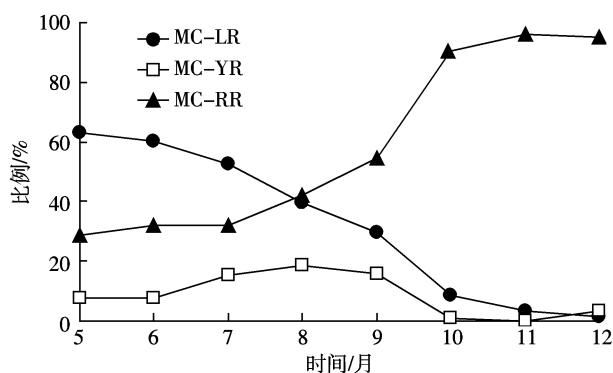


图4 微囊藻毒素3种异构体所占的比例随时间变化

Figure 4 Time variety of proportion of three isomers in total MCs

目前,已有不少学者对3种异构体(LR、RR和YR)在总MCs含量中所占的比例开展了研究,研究结果均表明LR和RR异构体所占的比例最大,是主要的毒素^[14-15]。本文调查也发现LR和RR异构体是水体中主要的微囊藻毒素,LR、RR和YR异构体在微囊藻毒素总量中所占的比例分别为1.46%~63.40%、28.82%~96.30%和0.19%~18.62%,其年平均值分别为32.41%、58.85%和8.73%。

但是,由于蓝藻的生长和毒素合成不是仅受某一因素影响,而是多种物理、化学、生物因素共同作用的

结果,而且各种产毒藻之间还存在一定的种群差异,因此不同学者关于LR和RR异构体大小问题的研究结果存在明显差异。有些研究结果表明LR异构体含量比RR异构体高,是最主要的毒素^[14];而有的则得到相反的结论,认为RR异构体是最主要的毒素^[15]。本文调查结果表明,在5—12月,LR和RR异构体在微囊藻毒素总量中所占的比例不一样,其比值随时间变化且呈下降的趋势,其比值从5月份的2.20一直降到11月份的0.04,其中8月之前其比值大于1.0,见图5。Oh等认为藻类细胞内LR和RR异构体的比值主要受水体中N/P比值的影响,LR和RR的比值随N/P比值的增加而增加^[16]。本文也得到类似的研究结果,水库全年实测TN浓度为 $0.267\sim5.694 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,TP浓度为 $0.022\sim0.375 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,氮磷N/P比值变化范围比较大,水库水体N/P比值从5月份的31.1一直降到12月份的7.2,LR异构体在MCs中所占的比例都呈下降趋势,而RR异构体所占的比例则呈上升趋势。因此,LR/RR比值不断减少,其比值随着N/P比值的减少而减少(见图5),但是N/P比值如何影响LR/RR比值,还需要开展进一步研究。

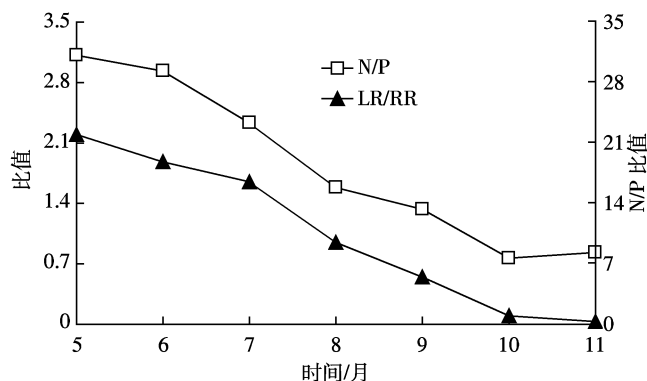


图5 微囊藻毒素异构体LR/RR比值与N/P比值的关系

Figure 5 Relationship between ratio of LR to RR and rate of nitrogen nitrogen and phosphate

3 结论

(1)水体中微囊藻毒素3种异构体的年变化过程存在明显差异:LR异构体出现时间最早,在4月下旬检出,而其他2种异构体则要到5月中旬才能检出;YR异构体在水体中持续时间最长,一直延续到次年的1月份,而其他2种异构体在12月底就消失了;LR和YR异构体峰值出现在8—9月,而RR异构体峰值出现在10—11月。

(2)在微囊藻毒素3种异构体中,LR和RR异构

体的含量比较高,是主要毒素。LR、YR 和 RR 异构体在微囊藻毒素总量中所占的比例分别为 12.42%~63.40%、10.80%~81.22%和 1.83%~21.05%,其年平均值分别为 32.4%、58.9%和 8.7%。

(3) 微囊藻毒素 LR 和 RR 异构体的比值随时间不断变化,在 5—12 月,其比值随时间变化且呈下降的趋势,从 5 月份的 2.20 一直降到 11 月份的 0.04,其中 8 月之前其比值大于 1.0。其比值与水体中的 N/P 比值具有明显的相关性,并且随着 N/P 比值的减小而减小。

参考文献:

- [1] Figueiredo D R, Azeiteiro U M, Esteves S M, et al. Microcystin-producing blooms—a serious global public health issue[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2004, 59(2):151–163.
- [2] Gupta N, Pant S C, Vijayaraghavan R, et al. Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice[J]. *Toxicology*, 2003, 188:285–296.
- [3] Haider S, Naithani V, Viswanathan P N, et al. Cyanobacterial toxins: a growing environmental concern[J]. *Chemosphere*, 2003, 52:1–21.
- [4] Codd G A. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritization of eutrophication control[J]. *Ecological Engineering*, 2000, 16:51–60.
- [5] Geoffrey A C, Louise F M, James S M. Cyanobacterial toxins: Risk management for health protection[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, 203(3):264–272.
- [6] Pouria W, De Aadrade A, Barbosa J, et al. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru[J]. *Brazil Lancet*, 1998, 352:21–26.
- [7] 连民, 陈传伟, 俞顺章, 等. 淀山湖夏季微囊藻毒素分布状况及其影响因素[J]. 中国环境科学, 2000, 20(4):323–327.
LIAN Min, CHEN Chuan-wei, YU Shun-zhang, et al. The distribution of microcystin and its influence factors in Dianshan Lake in summer[J]. *China Environmental Science*, 2000, 20(4):323–327.
- [8] 隋海霞, 徐海滨, 严卫星, 等. 淀山湖及鄱阳湖水体中微囊藻毒素的污染[J]. 环境与健康杂志, 2007, 24(3):136–138.
SUI Hai-xia, XU Hai-bin, YAN Wei-xing, et al. Pollution status of microcystin in Dianshan Lake and Poyang Lake in China[J]. *J Environ Health*, 2007, 24(3):136–138.
- [9] 郑利, 谢平, 林匡飞, 等. 武汉莲花湖微囊藻毒素含量变化特征及其影响因素的研究[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(6):1053–1057.
ZHENG Li, XIE Ping, LIN Kuang-fei, et al. Variation characteristics of microcystin concentration and influencing factors in Lake Lianhuahu (Wuhan)[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2004, 23(6):1053–1057.
- [10] 潘晓洁, 常锋毅, 沈银武, 等. 滇池水体中微囊藻毒素含量变化与环境因子的相关性研究[J]. 湖泊科学, 2006, 18(6):572–578.
PAN Xiao-jie, CHANG Feng-yi, SHEN Yin-wu, et al. The correlation between the variation of microcystin content and environment factors in Dianchi Lake[J]. *J Lake Sci*, 2006, 18(6):572–578.
- [11] 许秋瑾, 高光, 陈伟民. 太湖微囊藻毒素年变化及其与浮游生物的关系[J]. 中国环境科学, 2005, 25(1):28–31.
XU Qiu-jin, GAO Guang, CHEN Wei-min. Periodical change of microcystin in Taihu Lake and its relationship with plankton[J]. *China Environment Science*, 2005, 25(1):28–31.
- [12] Martin W, Christian S. Indirect photolysis of cyanotoxins: one possible mechanism for their low persistence[J]. *Water Res*, 1999, 33(5):1159–1164.
- [13] 张玮, 林一群, 郭定芳, 等. 不同氮磷浓度对铜绿微囊藻生长、光合及产毒的影响[J]. 水生生物学报, 2006, 30(3):318–322.
ZHANG Wei, LIN Yi-qun, GUO Ding-fang, et al. Influence of different nitrogen and phosphorus concentrations on growth, photosynthesis and microcystin production of microcystis aeruginosa[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, 30(3):318–322.
- [14] Susana Baldia, Ma Cecilia G Conaco, Toshitaka Nishijima, et al. Microcystin production during algal bloom occurrence in Laguna de Bay, the Philippines[J]. *Fisheries Science*, 2003, 69:110–116.
- [15] Park H D, Watanabe M F, Harada K-I, et al. Hepatotoxin(microcystin) and neurotoxin(anatoxin-a) contained in natural blooms and strains of cyanobacteria from Japanese freshwaters[J]. *Nat Toxins*, 1993(1):353–360.
- [16] Oh H M, Lee S J, Jang M H, et al. Microcystin production of microcystis aeruginosa in P-limited chemostat[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66:176–179.