

典型微囊藻毒素对白菜种子发芽的生态毒性

李彦文¹, 向 垒¹, 李梓君¹, 莫测辉^{1*}, 黄献培¹, 金 玉², 铁 程², 雷清毅¹,
詹晓静¹, 黄成彬¹, 陈键准¹

(1.暨南大学环境工程系, 广东省高校水土环境毒害性污染防治与生物修复重点实验室, 广州 510632; 2.云南省环境监测中心站, 昆明 650034)

摘 要:以白菜种子为实验对象,研究了微囊藻毒素(MC-LR 和 MC-RR)和铜绿微囊藻提取液对白菜种子发芽率、根伸长、芽伸长和生物量的影响,探讨其对白菜种子发芽的生态毒性。结果表明,在实验浓度范围内,MC-LR 和 MC-RR 毒性与白菜种子发芽的发芽率、根伸长抑制率、芽伸长抑制率和生物量抑制率之间存在显著的剂量-效应关系,毒性敏感高低指标为根伸长>芽伸长>生物量>发芽率,MC-LR 的毒性大于 MC-RR,其根伸长 50%抑制率浓度值(IC₅₀)分别为 3.32 mg·L⁻¹ 和 12.68 mg·L⁻¹。铜绿微囊藻提取液对白菜种子发芽的生态毒性远高于 MC-LR 和 MC-RR 纯品水溶液,是否由于藻液中多种微囊藻毒素共存时产生了毒性协同作用或藻液中其他毒性污染物的存在而引起的,其机理有待进一步研究。

关键词:微囊藻毒素;白菜;种子发芽;生态毒性

中图分类号:X503.231 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2012)10-1879-05

Ecotoxicity of Microcystins to Seed Germination of Chinese Cabbage

LI Yan-wen¹, XIANG Lei¹, LI Zi-jun¹, MO Ce-hui^{1*}, HUANG Xian-pei¹, JIN Yu², TIE Cheng², LEI Qing-yi¹, ZHAN Xiao-jing¹,
HUANG Cheng-bin¹, CHEN Jian-zhun¹

(1.Key Laboratory of Water/Soil Toxic Pollutants Control and Bioremediation of Guangdong Higher Education Institutions, Department of Environmental Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2.Yunnan Environment Monitoring Center, Kunming 650034, China)

Abstract: The eco-toxicological effects of microcystins (MC-LR and MC-RR) and the extract of *Microcystis aeruginosa* on the seed germination of Chinese cabbage were investigated. The influence of microcystins on the seed germination rate, inhibition rate of root elongation, shoot elongation and biomass were studied. Results showed that there existed significant dose-effect correlations between the inhibition rate of root elongation (or shoot elongation, or biomass) and concentrations of the tested two microcystins. The IC₅₀ of MC-LR and MC-RR based on root were 3.32 mg·L⁻¹ and 12.68 mg·L⁻¹ respectively, much less than the IC₅₀ values based on shoot and biomass, which indicated that the root elongation was the most sensitive physiological indicator to the two microcystins, followed by the shoot elongation, biomass and seed germination rate. MC-LR was more toxic than MC-RR. The eco-toxicity of cyanobacteria bloom to seed germination was much higher than the purified microcystins, which was probably the synergy effect of various microcystins or the possible presence of other potentially toxic compounds in the extract of *Microcystis aeruginosa*. The exact mechanism needs further study.

Keywords: microcystin; Chinese cabbage; seed germination; ecological toxicity

富营养化和全球变暖使世界各地的蓝藻水华日趋严重。蓝藻水华衍生的微囊藻毒素(MC)污染严重

威胁水生生态系统及人类健康。我国大部分重要河流、湖泊、水库甚至农村地区的湖塘、河港内都普遍检出微囊藻毒素^[1-6]。目前已发现近 70 种微囊藻毒素异构体,其中 MC-LR、MC-RR 和 MC-YR 是我国水域中检出最普遍和危害最严重的微囊藻毒素。微囊藻毒素的毒性与有机磷农药相当,长期低剂量接触能损伤肝细胞并诱发肝癌、肠癌,且具有致畸作用^[7-8]。水体中微囊藻毒素具有生物累积和生物放大效应^[9],能够在

收稿日期:2012-02-22

基金项目:广东省自然科学基金重点项目(2011020003196);暨南大学大学生创新创业训练计划项目(CX12043, CX11025);暨南大学科研培育与创新基金项目(216113133)

作者简介:李彦文(1973—),女,博士研究生,高级工程师,研究方向为有机污染生态学。Email: tlyw@jnu.edu.cn

* 通信作者:莫测辉 E-mail: tchmo@jnu.edu.cn

贝、鱼等水产品中富集^[10-11],进入食物链。微囊藻毒素通过饮水、食品长期痕量摄入人体导致肝癌、肠癌和肝损伤高发病率的现象遍布世界各地^[12],是公认的肝毒素和促癌剂,已被人们广泛关注。近年来微囊藻毒素对植物生长发育及农产品安全的影响也逐渐引起人们的关注^[13-14]。微囊藻毒素可通过被蓝藻污染的灌溉水等途径进入农田中,对作物生长发育、农产品质量和人体健康构成威胁^[15-16]。

大白菜是我国重要的蔬菜品种,同时也是EPA推荐用于生态毒性评价的高等植物。为此本文选用白菜为供试植物,研究我国水域中普遍检出的典型微囊藻毒素MC-LR、MC-RR和铜绿微囊藻提取液对白菜种子发芽的生态毒性,以期微囊藻毒素污染的生态风险评价提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试白菜品种为华南地区广泛种植 of 香港矮脚黑叶葵扇白菜,种子购自广州长合种子有限公司。微囊藻毒素标准品MC-LR和MC-RR购自Taiwan Algal Science Inc.,纯度>95%,为白色粉末状。释放微囊藻毒素的蓝藻属铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*),购自中国科学院水生生物研究所藻种库,编号FACHB-905。

铜绿微囊藻提取液制备:将铜绿微囊藻置于10 L玻璃瓶中光照通气培养,培养液为BG11,培养温度25℃,光强为20 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光暗周期为12 h:12 h,培养30 d。将藻液超声使藻细胞破碎释放胞内微囊藻毒素,离心后的上清液作为铜绿微囊藻提取液,用于白菜种子培养。提取液中微囊藻毒素含量测定方法参照文献[17],获得MC-LR和MC-RR的含量分别为1.47 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和0.05 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,此外还检测到MC-YR的含量为0.22 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,即提取液中3种微囊藻毒素的总含量为1.74 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。这些浓度与环境水体中微囊藻毒素的含量相当^[1,3-5]。用铜绿微囊藻的培养液将铜绿微囊藻提取液分别稀释10、100倍和1000倍,供白菜种子发芽实验用。实验所用水均为高纯水。

主要仪器设备:直径9 cm玻璃培养皿,光照培养箱(PYX-300G-B,科力仪器),LC-20AB高效液相色谱(SHIMADZU,日本)配紫外-DAD检测器。

1.2 实验设计与方法

1.2.1 预实验

白菜种子用10% H_2O_2 消毒后,用高纯水洗净。挑

选大小均一、形态饱满的种子置于内径为9 cm、铺有滤纸的培养皿中,每皿20粒,每个处理3次重复。

MC-RR溶液和MC-LR溶液各处理浓度分别为0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,以蒸馏水作为对照。盖好培养皿并用封口膜密封,置于培养箱中25℃避光恒温培养。按照EPA发芽试验规范,当对照组种子发芽率>90%、根长大于20 mm时,实验结束。观测并计算MC-RR和MC-LR对种子根伸长和芽伸长的50%抑制率浓度值(IC_{50})。

1.2.2 正式实验

根据预实验结果,在MC-RR和MC-LR对白菜种子根伸长抑制率0%~60%范围内,设置MC-LR和MC-RR单一处理的实验浓度为0.01、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,以蒸馏水作为对照,每个处理3次重复。与预实验相同条件下进行种子发芽实验。实验结束时,测定各处理种子的发芽率、生物量、根伸长和芽伸长(以胚轴与根之间的过度点区分根和芽)。计算根伸长和芽伸长的均值和标准偏差。以浓度-抑制率绘制曲线,进行回归分析,并根据回归方程计算根伸长和芽伸长抑制率分别为10%和50%的浓度值(IC_{10} 、 IC_{50}),其中把 IC_{10} 值作为引起植物受害的阈值, IC_{50} 值作为评价污染物毒性大小的关键值,其值越小,毒性越大。

用铜绿微囊藻提取液及其不同稀释倍数(10、50、100、500、1000倍)进行白菜种子发芽实验,以培养液作对照,每个处理3个重复,以考察实际蓝藻水华污染水体对白菜种子发芽的影响。

1.3 数据分析

有关指标的抑制率计算公式为:

$$\text{抑制率}\%=[(\text{对照}-\text{处理})/\text{对照}]\times 100$$

数据采用SPSS统计软件和Excel进行相关分析,并计算出 IC_{10} 值和 IC_{50} 值。

2 结果与分析

2.1 MC-LR对白菜种子发芽的影响

MC-LR在实验浓度范围(0.01~10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)内白菜种子发芽率为88.3%~96.7%(图1)。当MC-LR浓度小于1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,各浓度处理的发芽率与对照处理相比均没有显著差异($P>0.05$)。当MC-LR浓度大于2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,各浓度处理的发芽率与对照处理相比存在显著差异($P<0.05$),但各浓度处理之间的发芽率差异不显著。种子发芽过程主要来自胚内养分供应,受外界影响较小,因此MC-LR对白菜种子发芽率的影

响较小。

MC-LR 在实验浓度范围($0.01\sim10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)内对白菜种子发芽的根伸长和生物量均有不同程度的抑制作用,其抑制率分别为 $11.0\%\sim63.1\%$ 和 $17.2\%\sim45.1\%$;在低浓度($0.01\sim0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)时对白菜种子发芽的芽伸长有一定刺激作用,当浓度大于 $0.10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时开始表现为抑制作用,抑制率为 $0.8\%\sim49.0\%$ 。低浓度 MC-LR 对白菜种子发芽芽伸长的刺激作用是一种相当于类激素作用的“低剂量效应”,许多研究都有类似发现^[15,18]。MC-LR 对根伸长、芽伸长和生物量的抑制作用均随着浓度的增加而逐渐提高,“剂量-效应”相关系数均大于 0.90 ,抑制作用大小为根伸长>芽伸长>生物量,其 50% 抑制率浓度(IC_{50})相差较大,分别为 3.32 、 $10.93\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $91.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 2、表 1)。因此,白菜种子发芽根伸长对 MC-LR 的毒害作用最为敏感,可作为 MC-LR 生态毒性的评价指标。不同作物的种子发芽和幼苗生长对 MC-LR 毒害作用的响应浓度差异较大^[19-20]。

2.2 MC-RR 对白菜种子发芽的影响

与 MC-LR 相似,MC-RR 对白菜种子发芽率的

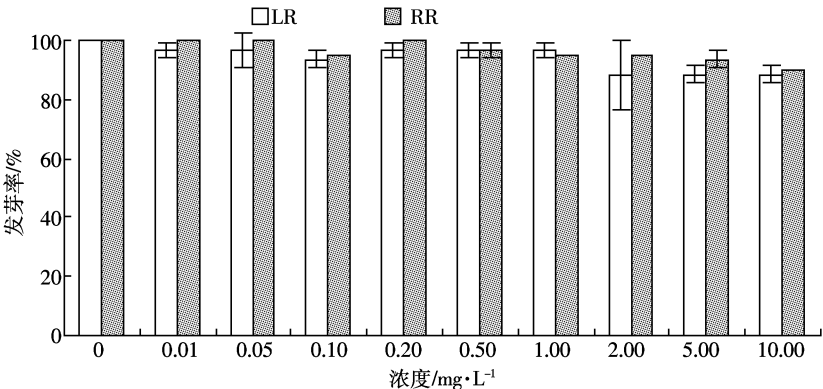


图 1 MC-LR 和 MC-RR 对白菜种子发芽率的影响

Figure 1 Effect of MC-LR and MC-RR on seed germination rate of Chinese cabbage

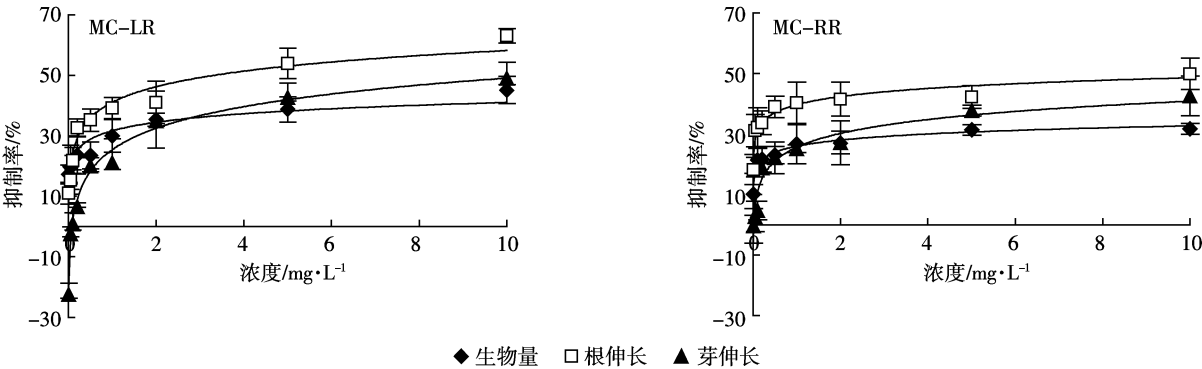


图 2 MC-LR 和 MC-RR 对白菜种子发芽生长的影响

Figure 2 Effect of MC-LR and MC-RR on seed germination of Chinese cabbage

表 1 MC-LR 和 MC-RR 浓度与白菜种子发芽抑制率相关性分析($n=9$)					
Table 1 Correlations of MC-LR and MC-RR concentration with inhabitation rate of Chinese cabbage seed germination($n=9$)					
项目	生理指标	拟合方程	R^2	$\text{IC}_{10}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$\text{IC}_{50}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
MC-LR	根伸长	$y=7.433\ln(x)+41.083$	0.956 7**	0.02	3.32
	芽伸长	$y=10.288\ln(x)+25.393$	0.990 1**	0.22	10.93
	生物量	$y=4.057\ln(x)+31.681$	0.903 5*	0.005	91.40
MC-RR	根伸长	$y=12.098\ln(x)+19.272$	0.935 9**	0.47	12.68
	芽伸长	$y=19.766\ln(x)-8.013\ 7$	0.870 8*	2.49	14.51
	生物量	$y=2.904\ln(x)+26.019$	0.950 0**	0.004	3 854.89

注:*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$; x 为微囊藻毒素浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), y 为抑制率(%).

影响较小,各处理下白菜种子发芽率为90%~100%(图1)。当MC-RR浓度小于 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,各处理浓度下白菜种子发芽率与对照处理相比差异均不显著($P>0.05$),当大于 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时差异显著($P<0.05$)。

各处理浓度下MC-RR对白菜种子发芽根伸长和生物量均产生抑制作用,抑制率分别为18.3%~49.9%和10.1%~31.7%,低浓度($0.01\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)时对芽伸长有刺激作用,当浓度大于 $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时开始表现为抑制作用,抑制率为2.7%~42.6%。MC-RR对根伸长、芽伸长和生物量的抑制作用“剂量-效应”相关系数在0.90左右,抑制作用大小为根伸长>芽伸长>生物量,其50%抑制率浓度(IC_{50})分别为12.68、14.51 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和3 854.89 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (表1、图2)。总体上看,MC-RR对白菜种子发芽的生态毒性小于MC-LR。

2.3 铜绿微囊藻提取液对白菜种子发芽的影响

铜绿微囊藻提取液对白菜种子发芽率有一定影响(发芽率90%),经稀释(10、50、100、500、1000倍)后这种影响消失(发芽率100%)。但稀释后的铜绿微囊藻提取液仍对白菜种子发芽的根伸长、芽伸长和生物量产生显著的抑制作用,其抑制率分别为31.0%~68.3%、17.9%~54.0%和-0.2%~26.0%(图3)。

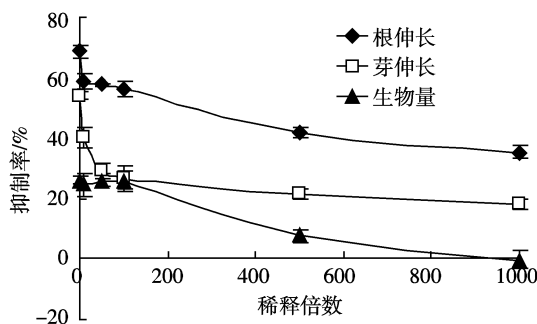


图3 铜绿微囊藻提取液对白菜种子发芽的影响

Figure 3 Effect of cyanobacteria bloom extract on seed germination of Chinese cabbage

尽管铜绿微囊藻提取液中微囊藻毒素总浓度远小于MC-RR和MC-LR标准品溶液的浓度,但前者对白菜种子发芽的影响(发芽率以及根伸长、芽伸长和生物量的抑制率)与后者相当甚至大得多,这与Silvia Pereira等^[21]的研究结果吻合,一方面可能由于提取液中还存在其他有毒污染物^[22],另外多种微囊藻毒素共存时有可能产生协同效应。此外,铜绿微囊藻提取液的pH值(8.9)呈碱性,影响种子周围矿质营养状况及氧气供应能力^[23],这些因素可能是导致铜绿微囊藻提取液毒性远高于微囊藻毒素纯品水溶

液的因素。

3 结论

微囊藻毒素MC-LR和MC-RR对白菜种子发芽的生态毒性存在明显的剂量-效应关系,前者的毒性大于后者,对根伸长的生态毒性最为敏感,其 IC_{50} 值分别为 $3.32\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $12.68\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。铜绿微囊藻提取液中微囊藻毒素MC-LR、MC-RR等浓度虽然较低,但对白菜种子发芽有严重影响。因此,铜绿微囊藻污染水体对生态环境的影响亟待关注。

参考文献:

- [1] Song Li-rong, Chen Wei, Peng Liang, et al. Distribution and bioaccumulation of microcystins in water columns: A systematic investigation into the environmental fate and the risks associated with microcystins in Meiliang Bay, Lake Taihu[J]. *Water Research*, 2007, 41(13):2853-2864.
- [2] Zhang Xia, Xie Ping, Hao Le, et al. Effects of the phytoplanktivorous silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) on plankton and the hepatotoxic microcystins in an enclosure experiment in a eutrophic lake, Lake Shichahai in Beijing[J]. *Aquaculture*, 2006, 257(1-4):173-186.
- [3] Li S, Xie P, Xu J, et al. Factors shaping the pattern of seasonal variations of microcystins in Lake Xingyun, a Subtropical Plateau Lake in China[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2007, 78(3-4), 226-230.
- [4] Xu Chuan, Chen Ji-an, Huang Yu-jing, et al. Identification of microcystins contamination in surface water samples from the Three Gorges Reservoir, China[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2010, 180:77-86.
- [5] 王非凤, 全川, 杨芳, 等. 福州山仔水库水华微囊藻毒素时空分布特征[J]. *环境科学学报*, 2011, 31(3):533-546.
WANG Fei-feng, TONG Chuan, YANG Fang, et al. Spatial and temporal distribution of microcystins in the Fuzhou Shanzai Reservoir[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2011, 31(3):533-546.
- [6] 李慧敏, 杜桂森, 姜树君, 等. 官厅水库的微囊藻毒素及其与水环境的相关性[J]. *生态学报*, 2010, 30(5):1322-1327.
LI Hui-min, DU Gui-sen, JIANG Shu-jun, et al. The correlation of microcystins and water environment factors in Guanting Reservoir[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(5):1322-1327.
- [7] Dawson R M. The toxicology of microcystins[J]. *Toxicon*, 1998, 36(7):953-962.
- [8] 谢平. 微囊藻毒素对人类健康影响相关研究的回顾[J]. *湖泊科学*, 2009, 21(5):603-613.
XIE Ping. A review on the studies related to the effects of microcystins on human health[J]. *Journal of Lake Sciences*, 2009, 21(5):603-613.
- [9] Ibelings B W, Chorus I. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater[J]. *Environmental Pollution*, 2007, 150(1):177-192.
- [10] Zhao Min, Xie Shouqi, Zhu Xiaoming, et al. Effect of dietary cyanobacteria on growth and accumulation of microcystins in Nile tilapia (*Ore-*

- ochromis niloticus* [J]. *Aquaculture*, 2006, 261(3):960-966.
- [11] Zhang Dawen, Xie Ping, Liu Yaqin, et al. Spatial and temporal variations of microcystins in hepatopancreas of a freshwater snail from Lake Taihu[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2009, 72(2):466-472.
- [12] Hernández Juan Martínez, López-Rodas V, Costas E. Microcystins from tap water could be a risk factor for liver and colorectal cancer: A risk intensified by global change[J]. *Medical Hypotheses*, 2009, 72(5): 539-540.
- [13] Codd G A, Metcalf J S, Beattie K A. Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria[J]. *Toxicon*, 1999, 37(8): 1181-1185.
- [14] Chen Jianzhong, Song Lirong, Dai Jian, et al. Effects of microcystins on the growth and the activity of superoxide dismutase and peroxidase of rape (*Brassica napus* L.) and rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Toxicon*, 2004, 43(4):393-400.
- [15] 薛延丰, 李慧明, 易能, 等. 微囊藻毒素(MC-RR)对白三叶种子萌发及幼苗生理生化特性影响[J]. 草业学报, 2009, 18(6):180-186.
- XUE Yan-feng, LI Hui-ming, YI Neng, et al. Effects of MC-RR on the seed germination and characteristics of physiology and biochemistry in *Trifolium repens* seedlings[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2009, 18(6): 180-186.
- [16] 李士杏, 付登强, 骆永明. 微囊藻毒素在土壤中的环境行为及污染风险[J]. 生态毒理学报, 2009, 4(3):324-331.
- LI Shi-xing, FU Deng-qiang, LUO Yong-ming. Environmental behaviour and risks of microcystins in soil[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2009, 4(3):324-331.
- [17] 陈海燕, 俞幸幸, 陈懿, 等. 高效液相色谱法同时测定水中三种微囊藻毒素[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(2):309-310, 315.
- CHEN Hai-yan, YU Xing-xing, CHEN Yi, et al. Study on simultaneous determination of three microcystins in water by high-performance liquid chromatography[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2011, 21(2):309-310, 315.
- [18] 陈苏, 孙丽娜, 孙铁珩, 等. 人工合成麝香对小麦种子发芽的生态毒性[J]. 环境科学, 2011, 32(5):1477-1481.
- CHEN Su, SUN Li-na, SUN Tie-heng, et al. Ecotoxicity of synthetic musks on wheat (*Triticum aestivum*) based on seed germination[J]. *Environmental Science*, 2011, 32(5):1477-1481.
- [19] 耿志明, 顾迎迎, 王澎. 微囊藻毒素对小白菜、番茄生长发育影响及其在它们体内积累的研究[J]. 江西农业学报, 2011, 23(9):21-24.
- GENG Zhi-ming, GU Ying-ying, WANG Peng. Effects of microcystin on growth and development of pakchoicabbage and tomato and its accumulation in them[J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2011, 23(9):21-24.
- [20] 钟友明, 张华, 陈健, 等. 微囊藻毒素 MC-LR 通过 NO 引起青菜幼苗的氧化胁迫反应[J]. 江苏农业学报, 2011, 27(4):842-847.
- ZHONG You-ming, ZHANG Hua, CHEN Jian, et al. Microcystins-LR-induced oxidative stress mediated by nitric oxide in *Chinese cabbage* seedlings [J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Science*, 2011, 27(4):842-847.
- [21] Pereira Silvia, Saker Martin L, Vale Micaela, et al. Comparison of sensitivity of Grasses (*Lolium perenne* L. and *Festuca rubra* L.) and Lettuce (*Lactuca sativa* L.) exposed to water contaminated with microcystins [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2009, 83(1):81-84.
- [22] Pflugmacher Stephan, Aulhorn Marika, Grimm Bernhard. Influence of a cyanobacterial crude extract containing microcystin-LR on the physiology and antioxidative defence systems of different spinach variants[J]. *New Phytologist*, 2007, 175(3):482-489.
- [23] Thompson D I, Edwards T J, Van Staden J. A novel dual-phase culture medium promotes germination and seedling establishment from immature embryos in South African Disa (Orchidaceae) species[J]. *Plant Growth Regulation*, 2007, 53(3):163-171.