

# 巢湖、太湖蓝藻湖靛 及其提取物的动物毒性初步研究<sup>\*</sup>

瞿文川

(中国科学院南京地理与湖泊研究所, 南京 210008)

苏晨伟

(南京大学制药厂, 南京 210008)

**摘要** 对国内淡水湖泊巢湖、太湖中的蓝藻湖靛及其提取物(藻胆蛋白),进行了动物毒性实验。实验动物为昆明种小白鼠,采用灌胃法给药。给药后小白鼠均无中毒症状,一周内无死亡。说明巢湖、太湖中蓝藻湖靛及其提取物,对以小白鼠为代表的哺乳类动物消化系统,基本不产生毒性。这对于开发两湖中的蓝藻作为鱼、家禽等饲料和提取其中的植物蛋白(藻胆蛋白)作为营养食品添加剂等有一定意义。

**关键词** 蓝藻湖靛 巢湖 太湖 毒性实验 微囊藻

## 1 前 言

国内淡水湖如巢湖、太湖中,当夏季气温较高时,蓝藻大量发生,其中有些种类还形成“水华”,或称湖靛<sup>①</sup>。当水华形成时,严重影响水质和环境卫生,这种蓝藻水华是否会产生毒素而影响人体健康,正在日益引起供水机构和公共卫生部门的关注<sup>[1]</sup>。

早在1978年Francis已发现泡沫节球藻(*Nodularia spumigena*)水华能够引起家畜和家禽中毒死亡。之后国内外又有许多介绍蓝藻水华毒性的文献<sup>[2~5]</sup>。目前已经知道能够产生毒素的淡水蓝藻大约有12属26种,其中易形成水华的常见种有铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)、水华鱼腥藻(*Anabaena flosaquae*)和水花束丝藻。这三种蓝藻分为有毒品系和无毒品系<sup>[2]</sup>。太湖、巢湖中蓝藻主要是由铜绿微囊藻为主体,约占湖靛总生物量的90%<sup>②</sup>。

目前有一些文献报道蓝藻水华能引起家禽、家畜和鱼类中毒情况,认为主要是因为其中有藻毒素存在,如微囊藻毒素(*Microcystis toxins*)等。但也有人认为蓝藻夜间能使水中含氧量减少甚至耗尽,死后分解产生有毒物质,如羟胺( $\text{NH}_2\text{OH}$ )、硫化氢( $\text{H}_2\text{S}$ )等,这样会使鱼类窒息、致病或死亡,甚至引起家禽、家畜的死亡<sup>[6]</sup>。因近年来我们发现太湖、巢湖当夏季高温季节蓝藻大量发生,已严重威胁工业、生活用水。为此各方面日益广泛开展蓝藻的防治和利用工作,包括沤制湖靛作肥料,将其加工制作为鱼类(尤其是鲢、鳙鱼等)的饵料和鸡鸭等家禽饲料,以及从中提取有效成份(如藻胆蛋白、色素等)作为营养食品添加剂等。但这些工作都不可避免地会碰到蓝藻毒性这一课题。所以进行有关太湖、巢湖蓝藻湖靛及其提取物的动物毒性实验是十分必要和有实际意义的。

· 中国科学院南京分院择优支持基金与中国科学院南京地理与湖泊研究所所长基金资助项目。

收稿日期:1995-01-11;接受日期:1995-07-15。

① 周万平,余源盛,徐志俊,隋桂荣,吴先成。巢湖渔业资源增殖研究资料(第2集)。1982:11~15。

② 叶诗鸣,蓝俊英,吴先成,车家甫。巢湖渔业资源增殖研究资料(第2集)。1982:1~5。

## 2 材料和方法

### 2.1 样品的采集及预处理

水华用 25 号浮游生物网从太湖、巢湖岸边进行采集。采样时间为 1994 年 10 月。将采回的蓝藻除去其中的一些漂浮的碎屑杂物,然后将藻液静置 1h,由于微囊藻有气囊存在这一特点,藻类将浮于上层。弃去清水和沉淀物,然后加入 2~3 倍体积的蒸馏水洗涤,再静置后弃去清水和沉淀物。用纱布将藻液滤干,装进塑料袋中低温保存。

### 2.2 试验样品的准备

进行动物毒性实验的样品共分为 7 组,包括 1 组蒸馏水对照组。

A 组:将采集的巢湖蓝藻经预处理。在水浴中蒸发加热 3h。取蒸发后的糊状蓝藻湖靛 9.6g,相当于 3.4g 干藻,加入蒸馏水至 20mL。搅匀后待用。

B 组:将采集的巢湖蓝藻经预处理。取 80g 蓝藻(相当于 6.3g 干藻),放入塑料离心管中。在冰箱中反复冷冻 3 次。然后在 4℃,15000 转速下离心 15min,取上清液。经滤纸过滤后为淡蓝色透明溶液,并发红色荧光。取 40mL 待用。

C 组:取 B 组中的过滤液 20mL,加入固体  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  达到 60% 饱和度,即加入 7.2g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。边加边搅拌,静置 1h,有淡蓝色絮状沉淀产生。将沉淀物溶于 20mL 蒸馏水中,为淡蓝色透明溶液。将其倒入透析袋中,放在蒸馏水中透析 24h,每隔 5~6h 更换一次蒸馏水。同时测定溶液的紫外可见吸收光谱。

D 组:将采集的太湖蓝藻经预处理。在水浴中蒸发加热 3h。取蒸发后的糊状蓝藻湖靛 7.2g,相当于 2.6g 干藻,加入蒸馏水至 20mL。搅匀后待用。

E 组:将采集的太湖蓝藻经预处理。取 60g 蓝藻(相当于 5.2g 干藻),放入塑料离心管中。以下同 B 组处理。得到粗提液 40 mL。

F 组:取 E 组中粗提液 20mL,以下盐析、透析步骤如 C 组。得到透析液 20mL,同时测定其紫外可见吸收光谱。

G 组:取蒸馏水 10mL 作为对照组。

### 2.3 试验动物

南京大学动物房繁殖饲养的昆明种小白鼠,体重 18~22g(♂)。随机分组。采用灌胃法给药。用一根塑料软管,从小白鼠口腔插入胃部,上接一注射器用于灌样。

### 2.4 给药数量及试验动物数目

A 组为巢湖鲜藻,每只小白鼠灌胃 1mL,共用 3 只小白鼠,浓度 8500mg/kg(折合微囊藻干重/公斤小白鼠,下同);B 组为巢湖蓝藻粗提液,每只小白鼠灌胃 1mL,共用 5 只小白鼠,浓度 8500mg/kg;C 组为巢湖蓝藻透析液,每只小白鼠灌胃 1mL,共用 5 只小白鼠,浓度 8500mg/kg;D 组为太湖鲜藻,每只小白鼠灌胃 1mL,共用 3 只小白鼠,浓度 6500mg/kg;E 组为太湖蓝藻粗提液,每只小白鼠灌胃 1mL,共用 5 只小白鼠,浓度 6500mg/kg;F 组为太湖蓝藻透析液,每只小白鼠灌胃 1mL,共用 5 只小白鼠,浓度 6500mg/kg;G 组为蒸馏水对照组,每只小白鼠灌胃 1mL,共用 2 只小白鼠。

### 2.5 实验记录

(1)在给小白鼠灌胃后 24h 之内,每隔 2~3h 观察记录其动态、食欲、体温、毛色等情况。

(2) 给药后连续观察一周。每天观察记录小白鼠动态、食欲、体温、毛色、排泄等情况。

### 3 结果

根据前面所述方法,对几组样品进行测试。结果如下:

(1) 对每组小白鼠采用灌胃法给药 1mL。给药 15min 后左右后小白鼠显得略微不安。这是由于给药后小白鼠胃部有发胀感觉所致。半小时后小白鼠渐渐安静下来,精神状态良好。没有急性中毒迹象。

(2) 接着连续观察一星期。每天记录小白鼠状态。包括小白鼠食欲、毛色、动态、排泄情况等。实验表明小白鼠毛色发亮,食欲良好,排泄正常,粪便外形正常、干湿适度。几组试验白鼠均无中毒和死亡情况发生,可下无毒结论(表 1)。

表 1 实验动物给药后生理状态观测记录

Tab. 1 Record of the physiological reaction of the testing animals after feeding with samples

组 别	动 态	食 欲	粪 便	体 温(°C)		体 重(g)	
				给药前	给药后	给药前	给药后
A	良好	正常	正常	37.4	37.3	20.2	22.5
B	良好	正常	正常	37.3	37.3	18.5	20.8
C	良好	正常	正常	37.5	37.6	19.2	21.5
D	良好	正常	正常	37.4	37.5	19.5	21.9
E	良好	正常	正常	37.4	37.4	21.6	23.5
F	良好	正常	正常	37.6	37.5	18.3	20.6
G	良好	正常	正常	37.4	37.4	17.6	19.9

### 4 讨论

关于蓝藻毒性问题的报道很多<sup>[7~9]</sup>。不同地区蓝藻种类及产生的毒性各异。如 1980 年渡边<sup>[10]</sup>研究了日本富营养型湖泊中微囊藻毒素对小白鼠的致死量为 50 mg/mL(指藻类粗提液中藻类的干重量);何振荣等<sup>[11]</sup>报道武汉东湖铜绿微囊藻(*M. aeruginosa*)的 LD<sub>50</sub>约为 100mg/kg(细胞粗提液中干重毫克数/公斤鼠重)。徐平等报道泰国地区微囊藻的 LD<sub>50</sub>为 58mg/kg 鼠体重;英国威尔士的微囊藻的 LD<sub>50</sub>则大于 800mg/kg,属基本无毒<sup>①</sup>。据报道国内淡水湖巢湖、太湖中蓝藻主要以铜绿微囊藻为主体,约占 90%。还有少量水华微囊藻以及螺旋鱼腥藻。Bishop 等早在 1959 年就对铜绿微囊藻 NRC-1 品系的毒素进行了全面的研究。研究发现毒素主要是由 7 种氨基酸组成的小分子环状多肽,其氨基酸 mol 分子组成为 1mol 的天冬氨酸、丝氨酸、缬氨酸和鸟氨酸及 2mol 的谷氨酸、甘氨酸和亮氨酸。这种多肽具有可透析、稳定、可被活性炭不可逆吸收、能溶于水等特点<sup>[12]</sup>。

本实验采集的样品分别来自巢湖和太湖。其中巢湖的蓝藻、细胞粗提液、透析液三组的剂量为 8500mg/kg;太湖蓝藻、细胞粗提液、透析液三组的剂量为 6500mg/kg。其中细胞粗提液采用反复冰冷法破碎细胞壁,可以抽提出其中的藻胆蛋白。它为营养型植物蛋白,这方

① 徐平。蓝藻毒素生物学研究。南京大学博士研究生毕业论文。1989:53。

面作者已经做了一些工作<sup>[13]</sup>,从抽提的藻胆蛋白主要为藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白,从蓝藻的细胞提取液的紫外可见特征吸收光谱曲线<sup>[13]</sup>看出,藻蓝蛋白,别藻蓝蛋白和蛋白质的特征吸收峰依次为 615nm、650nm 和 280nm 左右。同时细胞的破碎也使蓝藻中可能存在的毒素释放出来,从而尽量准确、全面反映蓝藻的毒性情况。而透析液的制取则是根据藻毒素的可透析性,采用盐析、透析达到进一步提纯藻胆蛋白和去毒的目的。可以看到使用的实验剂量范围为 6500~8500mg/kg(折合为微囊藻干重/公斤小白鼠),远远大于有关文献报道的微囊藻对小白鼠的致死量(100~1000mg/kg)。实验表明巢湖、太湖蓝藻并没有使小白鼠出现中毒和死亡情况。原因在于:

(1) 如前面所述,不同地区湖泊中蓝藻水华种类及表现出来的毒性差异较大。即使在同一湖泊中,形成蓝藻水华的种类也有更迭现象。易形成水华的主要有铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)、卷曲鱼腥藻(*Anabaena cercinalis*)、水华鱼腥藻(*Anabaena Flosaquae*)、水华束丝藻(*Aphanizomenon*)和美丽颤藻(*Oscillatoria formosa*)。其中铜绿微囊藻形成水华时间最长,主要生长在 5~11 月份,而高的氮素含量及高的 N:P 也有利于微囊藻水华发生<sup>[11]</sup>。本实验中采集的太湖、巢湖的蓝藻水华也以铜绿微囊藻为主体。

(2) 微囊藻水华的形成有明显的季节性,而它的毒性也常常表现出季节差异。其原因之一可能是不同品系的更迭;另一种可能是环境条件引起的变化。有实验表明<sup>[2]</sup>,微囊藻分为有毒品系和无毒品系,而无毒品系在一定环境条件下,如随着城镇工业的发展,大量工业废水及生活污水进入湖泊中,使得湖泊富营养化程度增高,以及湖水的温度、pH 等条件变化可以使其可能突变为有毒品系。据此,本实验结果说明从太湖、巢湖中采集的蓝藻,可能其中无毒品系居多,或者说在当时环境不具备突变为有毒品系的条件。

(3) Hughes 等在 1958 年从加拿大的 Little Rideau 湖中形成的无毒水华中分离得到有毒性的铜绿微囊藻 NRC-1 品系。发现微囊藻毒素是一种内毒素,完整的细胞并没有毒性,只有细胞破碎后毒素才释放出来<sup>[14]</sup>。1959 年 Bishop 等又发现微囊藻素是由 7 种氨基酸组成的小分子环状多肽,这种多肽具有可透析、稳定、可被活性炭不可逆吸收、能溶于水等特点<sup>[12]</sup>。这一特点为本实验中利用透析方法去除毒素提供了依据。同时也可以很好地解释以往利用太湖、巢湖等湖泊中蓝藻湖靛作为鱼饵料、鸡鸭等家禽饲料,均未发生中毒现象。

综上所述,对于巢湖、太湖的蓝藻湖靛及其细胞粗提液和透析液,对以小白鼠等哺乳类动物的消化系统基本不产生毒性。这就使得从巢湖等湖泊蓝藻湖靛中提取藻胆蛋白等营养成分作为食品添加剂等存在现实的可能性,并提供了一定的科学依据。当然,本文的工作只是关于太湖、巢湖蓝藻毒性问题的初步研究,尚不能完全否定太湖、巢湖蓝藻中藻毒素的存在,这有待于需要作进一步的定量分析研究。

致谢 本文得到中国科学院南京地理与湖泊研究所陈伟民、钱君龙、吴庆龙等同志及南京大学环境科学与工程系孔志明、章敏同志大力帮助,在此一并表示感谢!

## 参 考 文 献

- 1 俞家禄,陈明惠,林坤二,俞敏娟. 武汉东湖蓝藻水华毒性的研究(1):淡水蓝藻毒性的检测. 水生生物学报,1987,11

- (3):212~218
- 2 张成武. 淡水蓝藻毒性研究概况. 湖泊科学, 1992, 4(3): 87~94
  - 3 Morre R E, Patterson G M L, Myndese J S and J Barchi Jr. Toxins from cyanophytes belonging to the scytonemataceae. *Pure and Appl Chem*, 1986, 58: 263~271
  - 4 Carmichael W W. Hemagglutination method for detection of freshwater cyanobacteria (blue-green algae) toxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 1981, 41(6): 1383~1388
  - 5 Gorham P R. Toxin waterbloom of blue-green algae. *Can Vet J*, 1960, 1: 235~245
  - 6 Smith G M. The freshwater algae of the United States. New York: McGraw-Hill, 1950
  - 7 Carmichael W W. Freshwater blue-green algae(cyanobacteria) toxins—a review. In: The water environment. New York: Plenum Publishing Corp. 1981. 1~13
  - 8 Carmichael W W. Toxins of freshwater algae. In: A T Tu, ed. Handbook of natural toxins. Vol 3: Marine toxins and venoms. New York: Marcel Dekkar. 1988. 121~147.
  - 9 Francis G. Poisonous australian lake. *Nature*, 1878, 18: 11~12
  - 10 Mariyo F Watanabe and Shinshi Oishi. Toxicities of *Microcystis aeruginosa* collected from some lakes, reservoirs, ponds and moat in Tokyo and adjacent regions. *Jap J Limnol*, 1930, 41(1): 5~9
  - 11 何振荣, 俞家禄, 何家苑, 张甫英, 俞敏娟. 东湖铜绿微囊藻毒素的分离与鉴定. 水生生物学报, 1989, 13(3): 201~209
  - 12 Bishop C T, Anet E P L J and Gorham P R. Isolation and identification of the fast-death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1. *Can J Biochem Physiol*, 1959, 37: 453~471
  - 13 葛文川, 余源盛, 苏展伟. 巢湖蓝藻水华藻胆蛋白的分离与鉴定. 湖泊科学, 1995, 7(3): 289~292
  - 14 Hughes E O, Gorham P R and Zehnder A. Toxicity of a unialgal culture of *Microcystis aeruginosa*. *Can J Microbiol*, 1958, 4: 225~236

## PRELIMINARY STUDY ON THE TOXICITY OF WATER BLOOM IN CHAOHU LAKE AND TAIHU LAKE

Qu Wenchuan<sup>1</sup>      Su Chengwei<sup>2</sup>

(1: Lake Sediment & Environment Laboratory, Nanjing Institute of Geography and Limnology, CAS, Nanjing 210008;

2: Pharmaceutical Factory of Nanjing University, Nanjing 210008)

### Abstract

In recent years, due to the eutrophication of water-bodies, some freshwater lakes in China such as Chaohu Lake and Taihu Lake have been heavily contaminated by water bloom. In this paper, the mouse assay method was used to detect toxicity of blue-green algae and its extraction such as phycobiliproteins in Chaohu Lake and Taihu Lake. The results show no toxicity to experimental animals, which provided a scientific basis for further exploitation and utilization of bloom in Chaohu Lake and Taihu Lake as feed additive, nutriment, and so on.

**Key Words** Chaohu Lake, Taihu Lake, blue-green bloom, toxicity, microcystis