水华蓝藻产毒的生物学机制及毒素的环境归趋研究进展*

宋立荣, 陈 伟

(中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

摘 要: 本文介绍并评述了蓝藻水华中最常见的毒素——微囊藻毒素的产生途径和环境归趋的国内外研究进展. 主要内容包括: 微囊藻毒素的来源、结构和一般特性; 微囊藻毒素的分子合成机制、分布、产生规律及其功能; 以及微囊藻毒素的环境归趋. 重点介绍了在毒素环境归趋研究方面的重要突破, 指出了该领域研究中存在的问题和今后研究的重点方向.

关键词: 蓝藻; 微囊藻; 微囊藻毒素; 合成; 归趋; 研究进展

Production of microcystins in bloom-forming cyanobacteria and their environmental fates: a review

SONG Lirong & CHEN Wei

(State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, CAS, Wuhan 430072, P.R.China)

Abstract: The present paper introduces the recent progresses on the production mechanisms and environmental fates of microcystins—the most common toxins produced in bloom-forming cyanobacteria, in particular, *Microcystis*. The review contains three parts: (1)biological origin, structure and properties of microcystins; (2)synthesis, cellular distribution, production and possible function of the toxins; and (3)environmental fates of the toxins. Recent progresses, problems and perspectives in the study of environmental fates of toxins are viewed and discussed.

Keywords: Cyanobacteria; *Microcystis*; microcystins; synthesis; fate; review

1 微囊藻毒素的来源、结构和一般特性

微囊藻毒素(microcystins, 简称MCs)是由在水体中生长并能形成水华的几种蓝藻(blue-green algae, 亦称为蓝细菌cyanobacteria), 尤其是微囊藻(*Microcystis*)产生的一类藻类毒素. 在我国富营养化淡水水体中, 蓝藻水华污染造成的最主要危害之一就是产生和释放以微囊藻毒素为主要类型的蓝藻毒素. 除了微囊藻外, 蓝藻门中的鱼腥藻属(*Anabaena*)、浮丝藻属(*Planktothrix*)、束丝藻属(*Aphanizomenon*)中的某些种类也能产生此类毒素.

MCs 是一类环状七肽化合物(分子结构如图 1 所示). 其中, 环肽结构中含有 X 和 Y 两个可变的氨基酸基团. X 和 Y 的不同氨基酸组合可以形成相应的 MCs 异构体, 如在 LR 型中, X 和 Y 分别代表亮氨酸和精氨酸, 此外, 还有 RR、YR 等其他多种类型藻毒素. 迄今, 从野外或实验室培养微囊藻中已分离出近 70 种毒素异构体^[1]. 在已知的 MCs 的异构体中, 以 MC-LR 的生理毒性最强(是目前已知毒性仅次于二噁英的剧毒化合物). MCs 结构中所含共轭二烯型 β 氨基酸, Adda(3 氨基-9-甲氧基-2,6,8 三甲基-10-苯基 4,6-二烯酸)是表达该类毒素生理活性的最主要特征结构, 分别通过形成 1,2 两个肽键与其他氨基酸缩合成环. 除 MCs 外, 还有一类名为节球藻毒素(Nodularin)的环状五肽也具有 Adda 结构.

MCs 和 Nodularin 两类肝毒素主要通过生物体的胆汁酸传输系统在生物体内运输并在肝脏、肾脏及消化道组织中累积, 然后通过共价键与蛋白磷酸酶结合. 这种结合将直接抑制蛋白磷酸酶 1 和 2A 的活性,

* 国家重点基础研究发展计划项目(2008CB418000)和中国科学院重大交叉项目(KZCX1-YW-14-1)联合资助. 2009-08-03 收稿; 2009-08-25 收修改稿. 宋立荣, 男, 1961 年生, 研究员; E-mail: lrsong@ihb.ac.cn.

阻断蛋白磷酸化过程, 最终导致肝脏等器官的纤维化, 促发肿瘤形成. 研究表明, 当MCs特征结构Adda结合不等数量的氨基酸形成不同长度的肽键后, 就会对蛋白磷酸酶1和2A表现出不同程度的抑制作用, 即不同的毒性效应^[2]. 即使Adda只和一个氨基酸结合形成肽键后, 也会对蛋白磷酸酶起到一定的抑制作用. 但未形成肽键的Adda经生物检测, 未表现出明显毒性效应^[3]. 因此, Adda结构对这两类肝毒素的毒性行为起到至关重要的作用.

1996年, 在巴西Caruaru市, 由于医院使用的血液透析水被微囊藻毒素污染, 造成至少76人发生肝功能衰竭症状, 最终导致死亡^[4]. 这是因微囊藻毒素污染引起人类死亡的首次报道. 同年, 德国研究小组发现微囊藻中含有与已知的多肽合成酶同源的DNA序列, 由此推测微囊藻毒素的合成和其它环状小肽一样, 是由非核糖体合成的^[5]. 此突发重大事件的发生及其在蓝藻毒素分子生物学的突破性进展, 引起世界各国对蓝藻水华及其毒素问题的再次重视, 推动了相关研究领域的进一步深入.

在蓝藻毒素相关的研究领域之中, 其产生的生物学过程和机制, 尤其是环境归趋方面一直受到重点关注, 也是该领域研究的难点之一. 本文将重点介绍国内外在这方面的相关研究进展.

图1 微囊藻毒素化学结构通式

Fig.1 Chemical structure of MCs

2 微囊藻毒素合成的分子机制、分布、产生规律及其功能

2.1 产毒基因的发现

长期以来, 人们认为微囊藻毒性的有无和大小主要由环境因子决定. 但越来越多的证据表明, 并非所有的微囊藻都能够产生微囊藻毒素, 因此遗传学家认为, 微囊藻产毒株(Toxic strains)和无毒株(Nontoxic strains)的毒性是由遗传决定的. 为证实这一观点, 研究者进行了大量的微囊藻遗传结构研究, 但均未能找出真正产毒基因. 1996年, Meißner等发现有毒和无毒微囊藻中都含有与已知的多肽合成酶同源的DNA序列, 由此他们推测微囊藻毒素的合成和其它环状小肽一样, 是由非核糖体合成的(Non-Ribosome Peptide Synthesis)^[5]. Dittmann等从铜绿微囊藻HUB5-2-4中分离到一段称为mapep1的DNA片断, 它能特异地与产毒微囊藻杂交, 对这个片断的侧翼序列进行测序, 发现它是由一个多肽合成酶基因家族组成; 同时利用插入突变的方法敲除该基因的突变株失去了产毒特性, 由此证明该片段参与了微囊藻毒素的合成^[6].

2.2 微囊藻毒素合成酶基因的研究及基因转移系统的建立

在Dittmann等研究的基础上, Nishizawa等根据多肽合成酶基因的腺苷酸形成区域的保守氨基酸设计寡核苷酸引物, 在微囊藻中扩增, 以扩增得到的PCR产物为探针, 筛选基因组文库. 对克隆的片段测序分析, 发现了3个与微囊藻毒素合成有关的基因: mcyA, mcyB, mcyC. mcyA全长8361bp, mcyB位于mcyA的

下游12bp处, 全长6378bp, mcyC全长3870bp, 与mcyB有一个碱基的重叠, 即mcyB的终止密码子TGA中的A与mcyC起始密码子ATG共用. 这3个基因共同组成5个氨基酸的激活module, 即MdhA, D-Ala, L-Leu, D-MeAsp, L-Arg. 为了证明mcy基因的功能, mcyA中包括氨基酸激活和差向异构约2.7kb的DNA片段被突变, 并通过大肠杆菌-微囊藻混合进行结合转移. 分离到的突变株显示, 该微囊藻不再产生野生株的主要毒素^[7]. 此后, Nishizawa仍然用筛选文库的方法克隆和测序了34kb的产毒微囊藻DNA片段, 再次分离到4个基因: mcyD, mcyE, mcyF, mcyG, 这4个基因组成的操纵子位于mcyA的上游, 与mcyABC组成的操纵子方向相反. 通过基因mcyB, mcyD, mcyE的插入突变使该微囊藻不再产生毒素. 经分析, mcyDEFG组成一个多酮类合成酶复合物, 负责微囊藻毒素结构中Adda和谷氨酸的合成^[8]. Tillett等通过基因突变和突变体分析, 在一55kb长的DNA片段中找到了2个操纵子, 由10个双向转录的开放阅读框组成即mcyA-C和mcyD-J. 在微囊藻毒素合成的48个顺序催化反应中, 45催化区域定位于6个多酶合酶/合成酶(McyA-E, G)中, 它们将前体苯基乙酸, 丙二酰辅酶A, S-腺甘甲硫氨酸, 谷氨酸, 丝氨酸, 丙氨酸, 亮氨酸, D-甲基-异-天冬氨酸和精氨酸转入毒素的合成中. 另外4个基因为单体酶, 蛋白McyJ的作用为O-甲基化, McyF为差向异构, McyI为脱氢, McyH为定位. 至此, 微囊藻毒素合成酶基因的结构基本清楚, 即mcyABC(多肽合酶)和mcyDE(杂合的多酮-多肽合酶)2个主要操纵子, 另外还有修饰辅助基因^[9].

微囊藻毒素合成酶基因的分离和功能研究不仅揭示了微囊藻毒素合成的遗传基础, 还在微囊藻中建立了基因转移系统, 即大肠杆菌-微囊藻混合转移系统. 这是不同于前面直接用质粒转化的另一种基因转移系统. 方法上也存在较大差异: (1)氯霉素抗性基因盒中自身的启动子被切除, 换上的是*M.aeruginosa* K-81基因rpoD1的启动子P1和P2, 该启动子在微囊藻中的转录表达非常强烈; (2)转化质粒中被插入了mob基因, 该基因可使质粒高效率转移. 基因转移系统的建立为在微囊藻中开展其它基因的功能研究奠定了一定的基础, 但两种基因转移系统的效率都很低. 目前, 在数种形成水华的蓝藻中, 除浮丝藻易于基因操作外, 其他如微囊藻等水华蓝藻的基因转化方法目前仅在少数几个实验室中能够进行, 难以重复. 这是迄今为止在微囊藻毒素的分子生物学研究进展缓慢的主要原因.

2.3 微囊藻毒素在细胞内的分布和形成规律

确定毒素在细胞内的合成位点是了解其功能的前提之一. Shi等利用多克隆抗体, 纳米尺度金标记蓝藻毒素 microcystins 和 nodularins, 发现毒素主要集中在细胞的类囊体和核区, 在细胞壁和细胞的鞘壁上也有少量存在^[10]. 由于超显微样品制备中使用的有机溶剂乙醇可提取胞内的毒素, 对毒素定位实验可能产生干扰, Young等利用低温切割技术进行了毒素在细胞定位, 发现毒素大量存在于细胞的类囊体和核质区以及在多聚磷酸体, 在细胞膜和细胞壁周围仅有少量分布^[11-12]. Orr和Jones研究首次证明微囊藻毒素的产率与细胞的分裂速率具有显著的正相关关系, 随后他们证明在氮限制培养下, 细胞毒素的含量可由生长速率预测^[13-14]. 其他一些研究者采用连续培养方式, 也发现在限制光强^[15]或磷限制条件下^[16], 毒素浓度的变化与生长速率呈线性相关. 上述重要发现, 为开展环境因子对毒素含量和合成速率的研究提供了新的思路. Kameyama等指出, 毒素的浓度与细胞DNA的含量有着正的线性关系, 随着细胞的分裂, 毒素含量增多, 在G₀/G₁期最小, G₂/M期达到最大^[17].

2.4 微囊藻毒素的功能初探

长期以来, 微囊藻毒素产生的生物学意义及功能一直受到研究者的关注, 但进展甚微. 早期研究表明, 微囊藻毒素可作为微囊藻抵御捕食者或竞争者的防御分子或化感物质^[18], 或作为胞内金属离子螯合剂^[19], 也有报道毒素的形成与水华爆发和优势维持相关^[20-21]. 近年来, 德国研究小组发现微囊藻毒素可能参与胞内信号传递与基因调控^[22-23]. 2004年, 芬兰Sivonen研究小组报道毒素合成酶基因早于后生物基因出现, 此前所认为的毒素为防御分子的观点并不可信^[24].

3 微囊藻毒素的环境归趋

3.1 藻细胞中毒素的释放及水柱中溶解态毒素的形成

如前所述, MCs是一类受产毒基因调控, 在胞内代谢产生的毒素. 蓝藻细胞正常生长过程中, MCs主要贮存于藻细胞内, 当藻细胞死亡后, 胞内毒素就会释放到水柱中形成溶解态毒素. 从20世纪90年代至

今,国际上一些实验室相继开展了室内培养试验考察 MCs 在藻细胞和培养基之间的分配过程,研究发现:处于对数生长期的微囊藻培养物中至多能释放 10%–20%的毒素到培养基中,大多数毒素依然存在于细胞内;当细胞进入静止生长期时,可能随着藻细胞死亡数量的增加,释放到培养基中的毒素的比例也会有所增加.研究还发现,即使在对数生长期已经结束,并且藻类培养物的生物量已经非常大的时候,可能只是很少一部分藻细胞会死亡^[11,25-27].因此,藻类生长周期里的大部分时间,溶解态毒素的含量维持在较低水平.在自然水体中微囊藻毒素大量释放到水柱中一般出现在水华大量衰亡的季节,或者水体中使用了杀藻剂后都会引起胞内毒素大量的释放.已报道的自然水体中微囊藻毒素的含量一般为 0–10 $\mu\text{g/L}$ ^[28-29],大多数水体中 MCs 的含量不会超过 1 $\mu\text{g/L}$.即使在我国滇池等富营养化污染十分严重的大型水体中,在水华季节水体中溶解性毒素含量也基本在世界卫生组织规定的 1 $\mu\text{g/L}$ 以下^[30].所以微囊藻毒素在环境中是如何消失的?其最终归趋是什么?探索这些问题的答案一直是该研究领域的热点之一.

3.2 底泥沉积物吸附及降解

蓝藻毒素主要以细胞结合态、溶解态和吸附于悬浮物或沉积物等多种形式存在于水环境中,它在水中悬浮颗粒物上的吸附量并不大,不像多环芳烃等非极性污染物那样易于吸附在颗粒物上,该类毒素主要存在于水柱中. Rapala等在实验室内模拟研究了微囊藻毒素从水柱中溶解态向底泥中迁移的过程,结果显示自然水体中悬浮颗粒物吸附水柱中溶解态毒素的能力非常有限,通常至多20%的MCs能被水柱中悬浮颗粒物吸附.他们认为底泥沉积物对微囊藻毒素的吸附作用有限,与水柱中悬浮颗粒物相似,从而认为水环境中微囊藻毒素的归趋主要发生在水柱中^[31].受上述研究结果的影响,此后若干年很少有关于微囊藻毒素在底泥界面的研究报道.直到2001年, Tsuji等利用MMPB方法测定了湖泊底泥沉积物中的微囊藻毒素,该研究发现在测定的11个样品中有6个显示了阳性结果^[32],因此他们认为自然条件下底泥沉积物对微囊藻毒素归趋的影响不容忽视.此后, Chen等基于微囊藻毒素与底泥和土壤颗粒中金属离子形成配合物的吸附机制,建立了底泥和土壤中微囊藻毒素的提取分析方法^[33].该研究还对武汉东湖关桥鱼塘底泥中的毒素进行测定,发现多数底泥样品呈现阳性结果. Chen等在太湖一周年的原位跟踪实验并结合模拟试验发现:底泥界面是微囊藻毒素主要的归趋场所,其自然归趋的主要途径是生物降解途径,底泥沉积物中的细菌对微囊藻毒素的生物降解起到关键的作用^[34].

3.3 微囊藻毒素的光降解

微囊藻毒素因为具有环状的结构,化学性质十分稳定,其理化性质第一节已经作了详细介绍.在无光接近自然水体理化性质的条件下,微囊藻毒素可稳定存在数月甚至几年.但在有光的条件下,会发生缓慢的光降解反应.特别在有溶解性色素的存在下,光降解速率会显著加快^[30,35].如果在水体中含有大量色素,最快在两周内,微囊藻毒素可降解90%,降解过程最慢也不会超过6周.上述研究认为:光降解速率的快慢主要取决于色素或者毒素的初始含量(但关于这方面的研究依然需要深入开展).近年来,关于毒素降解的另外一些报道^[36-37]认为:微囊藻毒素在自然水体中能快速被降解的原因是水体中有丰富的光敏剂——溶解性腐殖质,它们的存在将为降解反应起到光催化作用,进而加速降解反应的进程.研究发现,当自然水体中溶解性腐殖质含量达到2–16 mg/L 的时候,夏天日光照射的条件下大约每天40%的微囊藻毒素将会从水体中去除.但在透明度低和浊度高的水体中,这个降解过程会变得很慢.张维昊等在云南滇池开展的光降解研究中也获得了类似的结果^[30].于是他们提出光降解是微囊藻毒素在自然水体中不能持久存在和含量较低的主要原因.然而,在大型富营养化的自然水体中,透明度和浊度与实验室条件下的相比往往相差甚远.由于多数水华型湖泊水面被厚厚的水华所覆盖,透明度非常低,加之风浪等原因,水体非常混浊,因此,光降解所起到的作用可能非常有限.近几年, Welker和Steinberg等在德国的一些湖泊中继续开展了毒素的光降解研究,他们又提出在自然条件下由于光照很难穿透水柱,因此光降解对毒素归趋的真正贡献可能不大. Welker和Steinberg最近的研究认为微囊藻毒素在单独自然阳光的照射作用下很难降解,只有在光敏剂如水体腐殖质的催化作用下光降解反应才会发生^[38].该研究认为太阳光降解作用对蓝藻毒素自然归趋过程的贡献十分有限,估计原位光降解半衰期在90–120d左右.可见,针对自然环境下光降解对微囊藻毒素环境归趋的贡献大小尚存争议,需要开展进一步研究进行

论证。

3.4 微囊藻毒素的生物降解

微囊藻毒素虽然在自然条件下表现出很强的化学稳定性,但已经在水体里发现了许多水生细菌可以降解微囊藻毒素。具有降解MCs能力的细菌种类很多,常见的主要是*Pseudomonas aeruginosa*^[39]和*Sphingomonas* sp.等属中的一些菌株^[40]。这些细菌在世界范围内各种水体中的分布相当普遍,有的分布在污水沟里^[41],有的分布在湖水里和湖泊底泥中,还有些细菌是在河水里发现的^[31,42-45]。细菌降解一般都有一个滞后期,在滞后期内毒素浓度无明显减少。滞后期时间少则两天,多则三周以上,主要取决于水体理化性质,气候条件等^[42,46],滞后期过后,90%毒素会在接下来的2-10d内快速降解。1994年Jones等分离出一种水生细菌*Sphingomonas*,可将微囊藻毒素环状结构打开变成直链毒素,最后进一步发生降解^[42]。他们还对降解产物的毒性进行了生物测试,发现直链毒素的毒性比微囊藻毒素LR的毒性降低了200倍;最终降解产物以500 μ g/kg的剂量腹腔注射小白鼠没有发现明显的毒性症状。2004年Harada等同样以细菌*Sphingomonas* strain, B-9对微囊藻毒素进行降解,从微囊藻毒素的降解产物中分离纯化出了Adda并鉴定了其化学结构^[47]。Ishii等也在日本的淡水湖泊中分离了一种能降解微囊藻毒素细菌,该革兰氏阴性菌被命名为7CY,经过16S rRNA鉴定确定为*Sphingomonas*属中的某种^[48]。目前国际上发现并鉴定的可降解微囊藻毒素的细菌很多是*Sphingomonas*属中的种类。生物降解可能是微囊藻毒素降解的重要途径之一,但生物降解作用在微囊藻毒素归趋的众多途径中究竟能起到多少作用,目前还没有确切的数据。虽然水体中存在可以降解毒素的细菌,但这些降解数据绝大多数是在实验室培养条件下获得的;而实验室培养条件下单位培养基中细菌的生物量远远大于自然水体中这种细菌存在的数量,如果将实验室培养物浓度稀释成自然体积条件下细菌浓度,还能否有效降解毒素?除此,温度、酸度等气候和水体理化性质因素也是影响细菌降解能力的重要原因。究竟自然水体中细菌能否快速清除微囊藻毒素?围绕上述问题,Chen等近期在江苏太湖开展的研究表明:在太湖这类浅水大型湖泊中,微囊藻毒素在底泥中的生物降解过程及源于底泥的细菌导致MCs在水柱中发生的生物降解过程可能是微囊藻毒素主要的自然归趋途径^[34]。

3.5 微囊藻毒素在水生生物体内的积累及代谢

微囊藻毒素在水生生物体内的积累和代谢也是其非常重要的环境归趋途径之一。微囊藻毒素进入水生动物主要的途径有三:水生动物摄食有毒蓝藻,溶解态毒素通过皮肤及消化道等器官吸收,以及摄食其他水生生物通过食物链转移进入体内。在过去的十多年中,已有较多研究表明微囊藻毒素可以在水生生物体内积累,这些研究主要包括MCs在鱼体中的累积^[49-50];蚌类中的累积^[51-54];螺中的累积^[55-56]以及浮游动物中的累积^[57-58]。这些研究发现微囊藻毒素对脊椎动物的靶器官主要为肝脏,并且在肝脏中可以大量积累,而对于无脊椎动物其攻击的靶位器官主要为肝胰腺和消化道组织,Falconer, Eriksson和Watanabe等开展的MCs暴露蚌的研究,发现在蚌的肝胰腺中积累了大量的微囊藻毒素。到目前为止,大量关于微囊藻毒素在水生动物体内积累的研究,大多是聚焦于毒素对水生动物的毒性作用机制方面,目的在于寻找毒素作用的器官,试图发现像哺乳动物肝脏一样被MCs进攻的靶位器官。尽管有大量报道证实了毒素在水生生物体内的累积和迁移,但对鱼类等水产品中累积毒素的量是否能够对人类健康产生真正的威胁尚无确切的答案。国际上负责水产品安全的权威机构也只是向人们建议不要食用鱼等水产品的内脏,并未对其安全性给出确切的评价。除了水生动物外,近年来也陆续报道了一些关于毒素在水生植物和藻类中累积的一些研究结果。当微囊藻毒素进入水生生物体内,一部分会被积累在生物体内,还有一部分会被生物体代谢降解^[59-60]。因此水生生物,特别是大型水生植物对溶解性毒素的吸收和降解也可能是微囊藻毒素在水生环境中的降解途径之一,这也为利用生态修复途径治理蓝藻毒素的污染提供新的思路。1998年,Pflugmacher等先后在实验室中发现当大型沉水植物、鱼和蚤等生物体吸收积累了微囊藻毒素后,累积的MCs会与生物体中谷胱甘肽转移酶形成结合物,进而进行开环降解^[60]。根据上述研究理念,Nimptsch等在中国巢湖开展了深入研究,提出高等水生植物可以作为自然水体中MCs解毒的“绿色肝脏”^[61]。

3.6 微囊藻毒素在土壤中的归趋

迄今为止,微囊藻毒素的归趋研究主要集中在以水柱中以溶解态、细胞结合态、悬浮颗粒物吸附、在

生物体内积累及生物降解等方面。我们认为,在土壤中归趋也是微囊藻毒素必须关注和研究的重要途径之一。目前,在该领域的研究报道很少。其中一个研究报道了土壤对节球藻毒素的吸附作用^[62],该研究主要为了考察土壤能否有效去除水体中溶解性毒素,为使用河岸粘土滤床去除饮用水源中溶解态MCs的工艺寻找理论依据。Chen等研究了微囊藻毒素在土壤中的吸附动力学及迁移渗透行为,该研究评价了机械收获蓝藻水华进入土壤界面后的安全性^[63]。由于蓝藻水华污染在全球范围内日趋严重,各国都加大了对富营养化湖泊的整治力度。其中尝试之一是通过机械方法收集水面漂浮的水华以减轻污染。但收集有毒水华的堆放和处理可能会造成毒素进入土壤界面。在我国将大量收获蓝藻生物量进行资源化利用,其中方法之一是用来当作有机肥料肥田,这势必造成毒素在土壤中的释放、迁移甚至存在导致地下水污染潜在威胁。微囊藻毒素进入土壤界面除了机械收集蓝藻生物量的不合理堆放及肥田等资源化处理后,还有其他途径:(1)人工湿地进行富营养化修复和河岸沙滤水处理工艺及粘土滤床水处理工艺等;(2)使用蓝藻水华污染的水进行农业灌溉活动;(3)洪涝灾害将含蓝藻水华和毒素的水带入土壤界面。2000年Eynar等经取样调查发现:在Riga河附近的土壤为沙质土壤,因而不能有效防止含有MCs河水的渗漏,最终导致河水中溶解态的MCs渗透到地下水中,引起了地下水的污染^[64]。Codd等还发现使用含有水华的水进行农业灌溉,会造成微囊藻毒素在莴苣中积累^[65]。在国际上,最近还有研究开始关注采用富营养化湖水(含有痕量的溶解态MCs)灌溉,导致MCs在苜蓿草、黑麦草等植物中的累积现象。研究结果显示:即使采用含痕量溶解态毒素的湖水进行灌溉,可导致作物中累积MCs的量达到0.12~1.45g/kg,进而潜在地影响畜牧业和乳制品的质量^[66]。随着人类实践活动的不断深入,蓝藻毒素进入土壤界面后的生态及环境安全性评价已经不容忽视。因此,该领域的研究将成为今后可能的热点之一。

致谢:甘南琴、胡臣林参与相关研究资料的收集,谨致谢忱。

4 参考文献

- [1] Diehnelt CW, Dugan NR, Peterman SM *et al.* Identification of microcystin toxins from a strain of *Microcystis aeruginosa* by liquid chromatography introduction into a hybrid linear ion trap-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer. *Anal Chem*, 2006, **78**: 501-512.
- [2] Holmes CFB, Boland MP. Inhibitors of protein phosphatase-1 and -2A; two of the major serine/ threonine protein phosphatases involved in cellular regulation. *Curr Opin in Struc Biol*, 1993, **3**: 934-943.
- [3] Imanishi S, Kato H, Mizuno M *et al.* Bacterial degradation of microcystins and nodularin. *Chem Res Toxicol*, 2005, **18**: 591-598.
- [4] Jochimsen EM, Carmichael WW, An JS *et al.* Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *The New England Journal of Medicine*, 1998, **338**: 873-878.
- [5] Meißner K, Dittmann E, Borner T. Toxic and non-toxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* contain sequences homologous to peptide synthetase genes. *FEMS Microbiol Letts*, 1996, **135**: 295-303.
- [6] Dittmann E, Neilan BA, Erhard M *et al.* Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Mol Microbiol*, 1997, **226**: 779-787.
- [7] Nishizawa T, Asayama M, Fujii K *et al.* Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* spp. *J Biochem*, 1999, **126**: 520-529.
- [8] Nishizawa T, Ueda A, Asayama M *et al.* Polyketide synthase gene coupled to the peptide synthetase module involved in the biosynthesis of the cyclic heptapeptide microcystin. *J Biochem*, 2000, **127**: 779-789.
- [9] Tillett D, Dittmann E, Erhard M *et al.* Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem Biol*, 2000, **7**: 753-764.
- [10] Shi L, Carmichael WW, Miller I. Immuno-gold localization of hepatotoxins in cyanobacterial cells. *Arch Microbiol*, 1995, **163**: 7-15.
- [11] Young FM, Thomson C, Metcalf JS *et al.* Immunogold localisation of microcystins in cryosectioned cells of *Microcystis*. *J Struct Biol*, 2005, **151**: 208-214.

- [12] Fiona M, Young A, Louise F *et al.* Quantification and localization of microcystins in colonies of a laboratory strain of *Microcystis* (Cyanobacteria) using immunological methods. *Eur J Phycol*, 2008, **43**: 217-225.
- [13] Orr PT, Jones GJ. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnol and Oceanogr*, 1998, **43**: 1604-1614.
- [14] Long BM, Jones GJ, Orr PT. Cellular microcystin content in N-limited *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth rate. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 278-283.
- [15] Wiedner C, Visser PM, Fastner J *et al.* Effects of Light on the Microcystin Content of *Microcystis* Strain PCC 7806. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**: 1475-1481.
- [16] Oh HM, Lee SJ, Jang MH *et al.* Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* in a phosphorus-limited chemostat. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 176-179.
- [17] Kameyama K, Sugiura N, Inamori Y *et al.* Characteristics of microcystin production in the cell cycle of *Microcystis viridis*. *Environ Toxicol*, 2004, **19**: 20-25.
- [18] Babica P, Blaha L, Marsalek B. Exploring the natural role of microcystins: a review of effects on photoautotrophic organisms. *J Phycol*, 2006, **42**: 9-20.
- [19] Utkilen H, Gjølme N. Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**: 797-800.
- [20] Sedmak B, Kosi G. The role of microcystins in heavy cyanobacterial bloom formation. *J Plankton Res*, 1998, **20**: 691-708.
- [21] Ihle T, Jahnichen S, Benndorf J. Wax and wane of *Microcystis* (Cyanophyceae) and microcystins in sediments: a case study in Quitzdorf reservoir. *J Phycol*, 2005, **41**: 479-488.
- [22] Dittmann E, Erhard M, Kaebernick M *et al.* Altered expression of two light-dependent genes in a microcystin-lacking mutant of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Microbiology*, 2001, **147**: 3113-3119.
- [23] Zilliges Y, Kehr JC, Mikkat S *et al.* An extracellular glycoprotein is implicated in cell-cell contacts in the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *J Bacteriol*, 2008, **190**: 2871-2879.
- [24] Rantala A, Fewer DP, Hisbergues M *et al.* Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 568-573.
- [25] Sivonen K. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**: 2658-2666.
- [26] Lehtimäki J, Moisander P, Sivonen K *et al.* Growth, nitrogen fixation, and nodularin production by two Baltic Sea cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 1647-1656.
- [27] Negri AP, Jones GJ, Blackburn SI *et al.* Effect of culture and bloom development and of sample storage on paralytic shellfish poisons in the cyanobacterium *Anabaena circinalis*. *J Phycol*, 1997, **33**: 26-35.
- [28] Tsuji K, Setsuda S, Watanuki T *et al.* Microcystin levels during 1992-95 for Lakes Sagami and Tsukui-Japan. *Nat Toxins*, 1996, **4**(4): 189-194.
- [29] Song LR, Chen W, Peng L *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. *Water Res*, 2007, **41**: 2853-2864.
- [30] 张维浩, 方涛, 徐小清等. 滇池水华蓝藻中微囊藻毒素的光降解研究. *中国环境科学*, 2001, **21**: 19-22.
- [31] Rapala J, Lahti K, Sivonen K *et al.* Biodegradability and adsorption on lake sediments of cyanobacterial hepatotoxins and anatoxin-a. *Lett Appl Microbiol*, 1994, **19**: 423-428.
- [32] Tsuji K, Masui H, Uemura H *et al.* Analysis of microcystins in sediments using MMPB method. *Toxicon*, 2001, **39**: 687-692.
- [33] Chen W, Li L, Gan NQ *et al.* Optimization of an effective extraction procedure for the analysis of microcystins in soils and lake sediments. *Environmental Pollution*, 2006, **143**: 241-246.
- [34] Chen W, Song LR, Peng L *et al.* Reduction in microcystin concentrations in large and shallow lakes: water and sediment-interface contributions. *Water Res*, 2008, **42**: 763-773.
- [35] Tsuji K, Naito S, Kondo F *et al.* Stability of microcystins from cyanobacteria: effect of light on decomposition and

- isomerization. *Environ Sci Technol*, 1994, **28**: 173-177.
- [36] Shephard GS, Stockenström S, De Villiers D *et al*. Photocatalytic degradation of cyanobacterial microcystin toxins in water. *Toxicon*, 1998, **36**: 1895-1901.
- [37] Welker M, Steinberg C, Jones GR. Release and persistence of microcystin in natural waters Cyanotoxins: occurrence, causes, consequences. Berlin: Springer, 2001: 83-101.
- [38] Welker M, Steinberg C. Rates of humic substance photosensitized degradation of microcystin-LR in natural waters. *Environ Sci Technol*, 2000, **34**: 3415-3419.
- [39] Takenaka S, Watanabe MF. Microcystin LR degradation by *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease. *Chemosphere*, 1997, **34**: 749-757.
- [40] Bourne DG, Jones GJ, Blakeley RL *et al*. Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 4086-4094.
- [41] Lam AKY, Fedorak PM, Prepas EE. Biotransformation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR, as determined by HPLC and protein phosphatase bioassay. *Environ Sci Technol*, 1995, **29**: 242-246.
- [42] Jones GJ, Bourne DG, Blakeley RL *et al*. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by aquatic bacteria. *Natural Toxins*, 1994, **2**: 228-235.
- [43] Cousins IT, Bealing DJ, James HA *et al*. Biodegradation of microcystin-LR by indigenous mixed bacterial populations. *Water Res*, 1996, **30**: 481-485.
- [44] Lahti K, Kilponen J, Kivimäki AL *et al*. Removal of cyanobacteria and their hepatotoxins from raw water in soil and sediment columns. In: Kivimäki AL, Suokko T eds. Artificial Recharge of Groundwater. NHP/Report No. 38, Helsinki, 1996: 187-195.
- [45] Lahti K, Rapala J, Färdig M *et al*. Persistence of cyanobacterial hepatotoxin, microcystin-LR in particulate material and dissolved in lake water. *Water Res*, 1997, **31**: 1005-1012.
- [46] Harada KI, Imanishi S, Kato H *et al*. Isolation of Adda from microcystin-LR by microbial degradation. *Toxicon*, 2004, **44**: 107-109.
- [47] Ishii H, Nishijima M, Abe T. Characterization of degradation process of cyanobacterial hepatotoxins by a gram-negative aerobic bacterium. *Water Res*, 2004, **38**: 2667-2676.
- [48] Carbis CR, Rawlin GT, Grant P *et al*. A study of feral carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to *Microcystis aeruginosa* at Lake Mokoan, Australia, and possible implications for fish health. *J Fish Dis*, 1997, **20**: 81-91.
- [49] Beattie KA, Kaya K, Sano T *et al*. Three dehydrobutyrine (Dhb)-containing microcystins from the cyanobacterium *Nostoc* sp. *Phytochemistry*, 1998, **47**: 1289-1292.
- [50] Eriksson JE, Meriluoto JAO, Lindholm T. Accumulation of a peptide toxin from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* in the freshwater mussel *Anadonta cygnea*. *Hydrobiologia*, 1989, **183**: 211-216.
- [51] Falconer IR, Choice A, Hosja W. Toxicity of the edible mussel (*Mytilus edulis*) growing naturally in an estuary during a water-bloom of the blue-green alga *Nodularia spumigena*. *J Environ Toxicol Water Qual*, 1992, **7**: 119-123.
- [52] Prepas EE, Kotak BG, Campbell LM *et al*. Accumulation and elimination of cyanobacterial hepatotoxins by the fresh-water clam *Anodonta grandis simpsoniana*. *Can J Fish Aquat Sci*, 1997, **54**: 41-46.
- [53] Watanabe H, Shiratori T, Shoji H *et al*. Novel acyl-CoA thioesterase enhances its enzymatic activity by direct binding with HIV Nef. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, **238**: 234-239.
- [54] Ozawa K, Park HD. Accumulation and depuration of microcystin produced by cyanobacteria *Microcystis* in freshwater snail. *Limnol*, 2003, **4**: 131-138.
- [55] Chen J, Xie P. Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and -RR in two freshwater shrimps, *Palaemon modestus* and *Macrobrachium nipponensis*, from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China. *Toxicon*, 2005, **45**: 615-625.
- [56] Watanabe MM, Kaya K, Takamura N. Fate of the toxic cyclic heptapeptides, the microcystins, from blooms of *Microcystis* (cyanobacteria) in a hypertrophic lake. *J Phycol*, 1992, **28**: 761-767.

- [58] Chen W, Song LR, Ou DY *et al.* Chronic Toxicity and responses of several important enzymes in *Daphnia magna* on exposure to sublethal microcystin-LR. *Enviro Toxicol*, 2005, **20**: 323-330.
- [59] Pflugmacher S, Wiegand C, Oberemm A *et al.* Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochim Biophys Acta*, 1998, **1425**: 527-533.
- [60] Pflugmacher S, Wiegand C, Beattie KA *et al.* Uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR by aquatic macrophytes. *J Appl Bot*, 1998, **72**: 228-232.
- [61] Nimptsch J, Wiegand C, Pflugmacher S. Cyanobacterial Toxin Elimination via Bioaccumulation of MC-LR in Aquatic Macrophytes: An Application of the "Green Liver Concept". *Environment Science & Technology*, 2008, **42**: 8552-8557.
- [62] Miller MJ, Critchley MM, Hutson J *et al.* The adsorption of cyanobacterial hepatotoxins from water onto soil during batch experiments. *Water Res*, 2001, **35**: 1461-1468.
- [63] Chen W, Song LR, Gan NQ *et al.* Sorption, degradation and mobility of microcystins in Chinese agriculture soils: risk assessment for groundwater protection. *Environmental Pollution*, 2006, **144**: 752-758.
- [64] Eynard F, Mez K, Walther JL. Risk of cyanobacterial toxins in Riga waters (Latvia). *Water Res*, 2000, **34**: 2979-2988.
- [65] Codd GA, Metcalf JS, Beattie KA. Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Latuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicon*, 1999, **37**: 1181-1185.
- [66] Crush JR, Briggs LR, Sprosen JM *et al.* Effect of irrigation with lake water containing microcystins on microcystin content and growth of ryegrass, clover, rape, and lettuce. *Environ Toxicol*, 2008, **23**: 246-252.