

蓝细菌毒素研究进展

刘 萍 敖宗华 汤晓智 陶文沂*

(无锡轻工大学生物工程学院生物制药研究室 无锡 214036)

摘要: 蓝细菌毒素是水华中有毒蓝细菌产生的体内次生代谢产物, 根据其毒性可分为肝毒素和神经毒素, 是强烈的癌促进剂。蓝细菌裂解后释放蓝细菌毒素, 污染饮用水源, 危害人类的健康。阐述蓝细菌毒素的种类、性质、制备、检测, 以及从饮用水中去除蓝细菌毒素的方法。

关键词: 蓝细菌毒素, 分离, 检测方法, 脱毒

中图分类号: 939.22 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 03-0085-04

近年来大量工业废水、生活污水排入水体, 水体过度养殖投料等致使大多数淡水水体富营养化。随着富营养化程度的加剧, 原来极为丰富的水生植物的种类、分布、数量、演替等均发生了巨大变化。一些敏感的水生植物群落灭绝, 而个别抗性较强的

* 通讯联系人

收稿日期: 2000-11-30, 修回日期: 2001-02-14

种类如蓝细菌(蓝藻)等却成为优势种。在所有的淡水藻类中,毒素最强、污染范围最广泛且严重的为蓝细菌,但并不是所有的蓝细菌都是产毒的,目前认为有毒的有铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)、水华鱼腥藻(*Anabaena flosaquae*)、水华束丝藻(*Ao-genzomenon flosaquae*)、阿氏颤藻(*Oscillatoria agardhii*)、泡沫节球藻(*Nodularia spumigena*)等^[1],这些种类蓝细菌在夏秋季形成的水华中大量存在。它们死亡后将细胞内的毒素释放到周围水中,在很大范围内引起野生和家畜间歇性的、重复性的中毒致死。人们饮用或接触到含有一定量毒素的水时,可引起肝损伤、胃肠炎、腹泻、皮炎等^[2]。随着水体富营养化程度的提高,大量水华出现,毒素释放到水华中,对人们的健康造成极大的威胁。

1 毒素的种类及毒性

蓝细菌的几个属能够产生毒性次生代谢产物,它们可以归纳为两类:一类为肽类肝毒素,包括七肽微囊藻毒素(microcystins, MCYST)、五肽节球藻素(nodularins)和motopurin。这些肽类毒素以不可逆转的方式抑制蛋白磷酸酶的活性,导致许多细胞机制发生紊乱。基于它们的生化作用方式,证明这些复合物具有癌促进活性。另一类毒素为神经毒素,包括钠通道阻断剂蛤蚌毒素(saxitoxin)及其类似物、后突触神经肌肉阻断因子类毒素a(anatoxin-a)和同类毒素a(homoanatoxin-a)、有机磷胆碱酯酶抑制类毒素-a。肝毒素的代表为微囊藻毒素,神经毒素主要为鱼腥藻毒素a。

微囊藻毒素是蓝细菌产生的主要毒素种类,主要由*Microcystis*、*Anabaena*、*Nostoe*、*Oscillatoria*等属产生。其结构为一组环七肽复合物,分子量为1000左右。微囊藻毒素在结构上不是很保守,常在2位和4位的氨基酸位置和脱甲基或乙酰化氨基酸残基上发生变异。自从Bishop(1959)首次从*Microcystis aeruginosa*中分离出肽类肝毒素以来^[3],目前已鉴定有近50个微囊藻毒素变式,其中绝大多数具有较高毒性。在微囊藻毒素的许多变式中,其存在最普遍、含量相对较多、毒性较大的是微囊藻毒素MCYST-LR, MCYST-RR和MCYST-YR。L、R、Y分别代表可变氨基酸为亮氨酸、精氨酸、酪氨酸。结构式中还含有Adda(代表3-氨基-9-甲氧基-2,2,6-三甲基-10-苯基-4,6-二烯酸),它对毒素的生物活性有很大影响。研究发现,去除Adda后毒素毒性降低,证明Adda对微囊藻毒素的活性是必需的。

鱼腥藻毒素a是低分子量的仲胺,结构为带鸟嘌呤的有机磷酸酯,是最强烈的烟酰胺乙酰胆碱受体拮抗剂,作为突触后去极化神经肌肉阻断剂,致使呼吸停滞,动物在几分钟内死亡。小鼠LD₅₀为250μg/kg。鱼腥藻是第一个报道产生鱼腥藻毒素的蓝细菌,现已从水华束丝藻、颤藻、铜绿微囊藻等中分离出来。

2 蓝细菌毒素的分离和纯化

蓝细菌毒素的提取主要是用有机溶剂法,使用最多的有机溶剂是乙酸、甲醇以及混合溶剂甲醇-正丁醇-水;也有直接使用水超声波提取,得到蓝细菌毒素的粗提液,通过过C₁₈、Sep柱、纤维素柱、凝胶过滤柱、薄层层析和反相高效液相色谱等方法,将粗提液中的各种蓝细菌毒素分离开来。HPLC检测流分证明过DEAE-纤维素柱得2个纯组分。用快速层析法能够提取80%的MCYST,纯度达95%以上,但其它MCYST纯度为60%~80%。此法适合于不太复杂的蓝细菌。利用制备HPLC能够得到纯的微囊藻毒素。采用以上方法,能够分离到毫克级至克级的纯微囊藻毒素。

3 蓝细菌毒素的检测

3.1 生物学测定 生物测试主要采用毒理学的测定方法。生物学方法包括两种,一是根据微囊藻毒素和节球藻毒素对蛋白磷酸酶的抑制作用进行毒素含量测定,二是利用毒素的毒性直接进行动物实验。生物学测定被认为是筛选水华物质和实验培养藻株提取物的首选典型测定方法。其优点是:比较便宜,能够在几小时内测出结果,并可对测定物质进行毒性定性和定量分析,从中毒症状区分是肝毒素还是神经毒素,甚至是不同的神经毒素。缺点是不能检测到低含量的毒素,特别是对处理过的饮水;不能区分不同毒素的同系物;另外,还需要应用一定量的动物,特别是哺乳动物。

3.2 毒素化学分析和结构鉴定 迄今为止,已发现的蓝细菌毒素几乎都是水溶性毒素。应用红外吸收光谱法、质谱法和核磁共振法是确定化合物的分子量和结构式的强有力工具,获得的毒素物理性状为其它化学分析方法提供了依据。化学检测法主要有 TLC 法、HPLC 法、GC-ECD 法等。HPLC 是蓝细菌毒素分离和鉴定的必要手段之一。紫外检测器是 HPLC 应用最普遍的检测器。微囊藻毒素和节球藻毒素的最大吸收波长分别为 238nm 和 227nm。采用 HPLC,微囊藻毒素的检测限约为 $10 \sim 20 \mu\text{g/L}$ ^[4]。

3.3 免疫检测 最有可能成为检测蓝细菌毒素的方法是免疫检测方法。目前只有肽类毒素能够应用免疫检测方法。由于肽类毒素是半抗原,只具有免疫反应性,但没有免疫原性,不能激发机体免疫应答,产生的抗体既能够与肽类毒素结合,也能与载体结合。Chu 等(1989)应用微囊藻毒素-乙二胺-牛血清白蛋白免疫兔子产生的多克隆抗体,采用酶联免疫吸附实验(ELISA),可检测到 $0.05 \sim 1.0 \text{ ng/mL}$ 的微囊藻毒素含量,此多克隆抗体与所有微囊藻毒素和节球藻毒素具有良好的交叉反应,因此能够测定出所测目标中肽类毒素的总量^[5]。

另外,Dermott(1995)采集从免疫鸡的鸡蛋中提取抗体。此抗体能够识别 MC-LR、MC-RR 和其它形式的肝毒素,在水中能够检测的最低浓度为 95 pg/mL ^[6]。Yoshio(1995)应用 MCYST-LR 白蛋白、卵清蛋白连接作为免疫原生产单克隆抗体和产单克隆抗体杂交瘤细胞,此单克隆抗体与 MC-LR 和其它微囊藻毒素反应,同时也与有毒或无毒的铜绿微囊藻提取液发生反应,有可能是此单克隆抗体能够识别微囊藻毒素的一般结构^[7]。日本 MBC 公司已将单克隆抗体制成微囊藻毒素的 ELISA 试剂盒,可检测到 $0.05 \sim 1.0 \mu\text{g/mL}$ 的微囊藻毒素,其灵敏度可达 HPLC 的 1000 倍。ELISA 已成功地用于检测饮水和动物脑组织中微囊藻毒素的含量,它有可能发展成为检测肽类蓝细菌毒素的快速、简便、高效的免疫方法。

4 蓝细菌毒素的去除

蓝细菌毒素在细胞内产生,活的蓝细菌向细胞外分泌毒素的量少,只有当蓝细菌死后才将毒素释放出来。因此,需在蓝细菌生长时去除蓝细菌。除去蓝细菌的方法主要是采用杀藻剂控制其生长,或采用絮凝剂使蓝细菌沉积。

当蓝细菌裂解或采用杀藻剂使蓝细菌毒素释放到水中时,会使水中毒素含量超过健康标准,因此需要及时采取措施降低水中毒素含量。蓝细菌毒素主要的去除方法有:

4.1 物理方法 传统水处理的方法是采用絮凝——沉积——双层过滤——氯化,应用或不用活性炭(粉或颗粒)。评估水处理过程中蓝细菌毒素的去除效果表明,传统水处理工艺结合活性炭吸附,一般能够去除蓝细菌毒素 80% 以上,但是水中残余毒素量为

0.1~0.5 μg MC-LR/L, 此值处于加拿大饮用水健康水平的上限^[8]。

将毒素置于紫外光下照射时, 它主要形成3种非毒性复合物, 被鉴定为[4(e)-6(z) Adda] MC-LR 和 [4(z)-6(e)-Adda] MC-LR, 是 MC-LR 的 Adda 的同分异构体。另外, 还形成一个新的复合物: 环-Adda-MC-LR, 在紫外光下进一步降解成为无毒性的物质。

4.2 化学方法去除 Benoufella 研究表明, 用传统絮凝——过滤——氯化水处理过程并不能除去蓝细菌毒素。低剂量活性碳粉也不能改善效果, 但活性碳过滤伴随臭氧化能够完全去除毒素。臭氧具有处理破坏蓝细菌产生各种毒素的潜力。应用鼠生物技术来评估毒素的去除效果, 发现臭氧比过氧化氢等对 MC-LR 的去除效果更有效, 臭氧与过氧化氢联合应用比单独臭氧更有效。臭氧能够破坏生物碱神经毒素、鱼腥藻毒素-a 和 MC-LR。臭氧破坏肽类毒素的活性依赖于 pH 值, 在碱性条件下臭氧的效果下降, 因为在此条件下臭氧的氧化能力比酸性条件下低。采用臭氧化方法, 只要残余臭氧浓度为 0.4mg/L, 即能从饮水中去除蓝细菌毒素^[8]。

以前文献报道水的氯化并不破坏蓝细菌肝毒素的毒性。但 Nichilson (1994) 发现只要具有有效的氯气浓度, 氯气也能有效破坏毒素。在 30min 处理后残余氯浓度达到 0.5mg/L 时毒素被破坏。毒素的破坏依赖于 pH 值, 氯化剂如次氯酸钙(钠)在高剂量时也不是很有效, 主要是由于它们具有的 pH 值很高。采用氯化方法去除饮用水中蓝细菌肽毒素是实际可行的, 只不过应提供酸性条件和有足够的氯气浓度^[9]。

4.3 生物降解 水中内源微生物对蓝细菌毒素具有一定的降解作用。Jone (1992) 在实验室检测接种不同爆发水华历史的污泥、沉淀、水等肝毒素的降解程度, 发现在用杀藻剂处理后 MCYST-LR 具有双相降解方式, 即经过 9d 的停滞期后, 在 9~12d 内 MCYST-LR 被降解 500 $\mu\text{g}/\text{L}\cdot\text{d}$, 剩下 110 $\mu\text{g}/\text{L}$, 快速降解 3d 后, 降解率降低 (10 $\mu\text{g}/\text{L}$)^[10]。Cousius (1996) 在实验室条件下向水库水中加入 MCYST-LR 10 $\mu\text{g}/\text{L}$, 发现主要的生物降解发生在 1 周内。为了确定 MCYST-LR 的矿化程度, 采用自然微生物种群和通气条件培养。结果显示肽环对生物降解抗性较强, 因此矿化的程度不高。然而, 由于 MCYST-LR 的毒性主要依赖于 Adda 的侧链定位, 在生物降解过程中 Adda 受到影响, 从而使毒素毒性降低^[11]。Rapala (1994) 发现具有蓝细菌爆发历史的沉积物和没有任何水华历史的湖水沉积物中的微生物能够降解蓝细菌肝毒素和鱼腥藻毒素。鱼腥藻毒素的降解在加入水华爆发后的水和沉积物后即开始, 而肝毒素的降解可能与湖水发生水华的历史有关: 因为接种发生水华或发生水华后的接种物(水、污泥和沉淀)比没有发生水华的接种物的毒素降解要快得多^[12]。

Bourne (1996) 分离到一株细菌 *Sphengomonas* sp., 发现该菌细胞提取液含有微囊藻毒素酶活性, 能够在体外降解 MCYST-LR, MCYST-RR, 但不能降解五肽节球藻素。当细菌在蛋白和酵母提取物或葡萄糖和酵母提取物的培养基上生长时, 能够持续表达酶活性。该菌主要含有 3 个细胞内水解酶, 主要从微囊藻毒素 Adda 连接处切开环肽, 变为线性 MCYST-LR, 然后切断线肽成四肽(含 Adda), 最后切成更小的肽或氨基酸。中间的降解产物的生物活性比环肽低 150 倍左右, 将线肽 MCYST-LR 喂饲小鼠 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时无毒性, 表明剧烈肝毒素 MCYST-LR 在环打开后变为低毒复合物^[13]。

5 存在问题及展望

在水体中,引起蓝细菌大量发生已公认是由水体富营养化、温暖的水温、高的光强度和稳定的气候条件共同作用的结果。25%~95%的水华是有毒的,但不了解引起水华有毒的原因,为什么单一种类蓝细菌中毒素的种类和含量会有变化。Rapala (1993)研究发现,细胞内毒素含量随水中磷浓度的升高而升高,高温(25℃~30℃)和高光强度(2~100 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$)使毒素浓度降低,不同 MCYST 变式对生长促进因素反应不同^[14]。减少水体中磷的含量,不仅会降低蓝细菌含量,也会降低毒素含量。但还未确定磷是否是影响毒素含量及种类的决定性因素。

蓝细菌中存在毒素的作用还不为人知。MCYST 强烈的丝氨酸/苏氨酸蛋白酶抑制剂已显示出可能作为抗草食动物食用的保护性物质,或作为细胞内不活跃的自由 Fe^{2+} 的螯合剂,或在细胞内具有某些调节功能。最近发现,在海胆中蛋白磷酸酶的活性受大田软海绵酸(Ocadaic acid)(一种蛋白酶抑制剂)精确调控。人们需尝试鉴定蓝细菌内蛋白磷酸酶与 MCYST 之间是否具有此关系。

藻类毒素的多样性和毒素作用的复杂性使人们对藻类的产毒机理十分关注,究竟决定藻类产毒的物质基础是什么,仍然是值得研究的课题。

目前,饮用水中蓝细菌毒素的存在还没有引起人们的广泛重视,水处理过程中并没有将蓝细菌素的含量做为饮用水安全性的一个检测指标,主要的原因是还没有引起有关部门的重视。根据 Heno Y (1992) 调查中国原发性肝癌与饮水中微囊藻毒素的关系,发现二者呈显著正相关。基于原发性肝癌流行病学结果和微囊藻毒素在该区的含量调查,建议饮用水中微囊藻毒素含量为 $<0.1\mu\text{g/L}$, 而微囊藻毒素的检测限约为 10~20 $\mu\text{g/L}$ 。因此 HPLC 检测为阴性的水并不一定符合安全饮水标准^[15]。目前急需一种比较快捷的适合工业化的灵敏的检测方法。随着蓝细菌毒素提取方法的规模性扩大和蓝细菌毒素单克隆抗体生产技术的逐步完善,以及蓝细菌毒素免疫检测试剂盒的工业化生产,将会使蓝细菌毒素随时检测成为可能。

参考文献

- [1] Carmichael W. Microbiol 1981, 41 (6): 1383~1388.
- [2] Carmichael W. South Afri J Sci 1982, 78: 367~372.
- [3] Bishop C, Anet E, Gorham P. Can J Biochem Physiol 1959, 37: 453~471.
- [4] Roland W. Analyst. 1996, 121: 233~238.
- [5] Chu F, Xuan H, Wei R, et al. Appl Environ Microbiol 1989, 55 (8): 1928~1933.
- [6] Dermott C M, Feola R, Plude J. Toxicon. 1995, 33 (11): 1433~1442.
- [7] Yoshio U, Satoshi N. JPN. Kokai Tokkyo Koho JP 07. 89, 988 [95, 89, 988]
- [8] Benoufella F, Laplanche A, Boisdon V. Wat. Sci. Tech. 1994, 30 (8): 245~257.
- [9] Nicholson C. Water Res. 1994, 28 (6): 1297~1303.
- [10] Gary J, Philp T, Orr J. Wat. Res. 1994, 28 (4): 871~876.
- [11] Cousins L, Bealing H, James A. Wat Res. 1996, 30 (2): 481~485.
- [12] Rapala J, Lahti K, Sivonen K, et al. Lettets in Appl Microbiol 1994, 19: 423~428.
- [13] Bourne D, Jones G, Robert L, et al. Appl Environ Microbiol 1996, 62 (11): 4086~4094.
- [14] Rapala J, Sivonen K, Lyra C. Appl Environ Microbiol 1997, 63 (6): 2206~2212.
- [15] Heno Y, Nagata S. Tsutsumi Carcinogenesis 1996, 17 (6): 1317~1321.