

# 微囊藻毒素(MC-LR)在黑麦草幼苗体内的积累及其生长的影响

李慧明<sup>1,2</sup>, 干晓宇<sup>1</sup>, 邓 蕾<sup>1</sup>, 李建龙<sup>1</sup>, 石志琦<sup>2</sup>, 薛延丰<sup>2</sup>, 易 能<sup>2,3</sup>, 李优琴<sup>2</sup>

(1.南京大学生命科学院, 江苏 南京 210093; 2.江苏省农业科学院食品质量安全检测研究所, 江苏 南京 210094; 3.南京农业大学资源与环境资源学院, 江苏 南京 210095)

**摘 要** 采用室内发芽试验方法,研究了不同浓度微囊藻毒素 MC-LR 对黑麦草种子发芽率、幼苗生长及幼苗体内抗氧化酶 SOD、POD 和 CAT 活性的影响,同时用液相色谱/质谱法(L/MS 法)检测 MC-LR 在黑麦草幼苗体内的积累。结果显示,随着 MC-LR 处理浓度升高,黑麦草种子发芽率逐渐降低,MC-LR 对黑麦草幼苗株高和干重无显著影响,但  $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  MC-LR 处理对幼苗根长和鲜重具有显著抑制作用。MC-LR 处理提高了黑麦草幼苗体内 SOD 和 POD 活性,但高浓度 MC-LR 对两种酶活性又具有一定抑制作用。随着 MC-LR 处理浓度升高,MC-LR 在幼苗体内积累含量和生物富集系数逐渐增大。黑麦草幼苗体内可积累 MC-LR,这有可能通过食物链途径对食品安全造成一定潜在风险。

**关键词** 藻毒素; 黑麦草; 发芽率; 幼苗生长; 抗氧化酶; 积累

中图分类号 X503.231 文献标志码 A 文章编号 1672-2043(2010)01-0049-05

## The Accumulation of MC-LR in Ryegrass(*Lolium perenne* L.) Seedlings and Effects of MC-LR on the Growth of Seedlings

LI Hui-ming<sup>1,2</sup>, GAN Xiao-yu<sup>1</sup>, DENG Lei<sup>1</sup>, LI Jian-long<sup>1</sup>, SHI Zhi-qi<sup>2</sup>, XUE Yan-feng<sup>2</sup>, YI Neng<sup>2,3</sup>, LI You-qin<sup>2</sup>

(1.College of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 2.Institute of Food Safety, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 3.College of Resources and Environmental Science, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China)

**Abstract** Effects of different concentrations of MC-LR on germination rate of ryegrass seeds, the growth and activity of antioxidant enzymes like SOD, POD and CAT of ryegrass seedlings were studied, and the accumulation of MC-LR in seedlings was also detected by Liquid chromatography/mass spectrometry(L/MS)method. The results showed that with the concentration of MC-LR increased, germination rate of ryegrass seeds reduced. There were no significant effects on seedlings height and dry weight of ryegrass seedlings after treated by MC-LR for seven days, but significant effected on root length and fresh weight of ryegrass seedlings when the concentration of MC-LR was the highest of  $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . The activity of superoxide dismutase(SOD)and peroxidase(POD)increased with the MC-LR treatment when the concentration of MC-LR was lower but were inhibited when the concentration of MC-LR was higher. However, there was not a similar trend of the activity of catalase(CAT)of ryegrass seedlings observed after the MC-LR treatment. With the concentration of MC-LR increased, the contents of MC-LR accumulated in ryegrass seedlings and bioconcentration factor (BCF) were increased, respectively. The result that MC-LR could be accumulated in ryegrass seedlings suggests MC-LR may have potential food safety risk through the way of food chain as the livestock such as cattle and sheep fed on ryegrass.

**Keywords** microcystins; ryegrass; germination rate; seedlings growth; antioxidant enzymes; accumulation

微囊藻毒素(Microcystins,简称 MCs)是由水华蓝藻如微囊藻、颤藻和鱼腥藻等产生的一种具有肝毒性

的环状七肽,它对蛋白磷酸酶 1 和 2A 具有很强的抑制作用<sup>[1-2]</sup>,并可以破坏哺乳动物肝脏的血管,从而引起肝脏组织坏死,最终导致原发性肿瘤<sup>[3]</sup>。目前能检测到的微囊藻毒素有 60 多种异构体<sup>[4]</sup>,其中微囊藻毒素 MC-LR 是已知毒性最强、急性危害最大的一种淡水蓝藻毒素<sup>[5]</sup>。为此,世界各国和国际组织都制定了严格标准限制藻毒素<sup>[6]</sup>,我国现颁布执行的生活饮用水水

收稿日期 2009-06-04

基金项目:国家高技术(863 计划)专题项目(2007AA10Z231) 973 预研项目(2008CB117001)

作者简介:李慧明(1983—),女,满族,河北承德人,硕士,主要从事水污染控制以及污染水体水华爆发机理方面的研究。

通讯作者:李建龙 E-mail jlli2008@nju.edu.cn

质卫生规范也包含了藻毒素的检测项目<sup>[5]</sup>。

目前关于藻毒素对生物毒害作用的研究主要集中在微囊藻毒素对动物的作用及其机理上<sup>[7-9]</sup>。有关微囊藻毒素对植物尤其是陆生植物生长和生理方面影响的研究相对较少,而关于藻毒素在食物链中存在的安全风险尚没有明确研究。1995年,Kós等<sup>[10]</sup>首次报道MC-LR和其粗提物能够抑制芥菜幼苗的生长。Anja Peuthert等<sup>[11]</sup>用 $5.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的MC-LR和MC-LF处理11种农作物,结果显示这两种藻毒素异构体对植物细胞均产生了氧化胁迫作用,并能够在作物体内积累。黑麦草是常见的一种牧草,有关不同浓度MC-LR对黑麦草生理生化的影响以及在幼苗体内积累的研究鲜见报道。本试验研究不同浓度藻毒素粗提液对黑麦草种子的发芽率、幼苗生长及抗氧化酶活性的影响,并检测MC-LR在幼苗体内的积累,以期对藻毒素通过牛羊等牲畜取食黑麦草从而进入人类食物链的安全风险研究提供工作基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验材料为特高(tetragold)黑麦草(*Lolium perenne* L.)藻毒素标准样MC-LR购自Sigma公司;干藻粉购自中国科学院武汉水生生物研究所,-20℃冷藏备用。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 藻毒素提取和测定

处理所用藻毒素粗提液和黑麦草幼苗中藻毒素的提取参考本文作者等<sup>[12]</sup>的方法进行。用L/MS法测定MC-LR含量。液质联用仪型号:液相HP1200,质谱6410,Triple Quad L/MS液质条件参考Cong等<sup>[13]</sup>的方法,对于MC-LR,此方法检测的精度为 $0.1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。经测定用干藻粉提取的藻毒素粗提液为MCs异构体的混合物,MC-LR是其主要成分,浓度为 $8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。生物富集系数(Bioconcentration factor,BCF)是描述化学物质在生物体内累积趋势的重要指标,以单位鲜重幼苗体内积累的MC-LR浓度与MC-LR处理浓度之比计算生物富集系数<sup>[11]</sup>。

#### 1.2.2 发芽试验

发芽试验方法参考GB-T 3543[1],4—1995《农作物种子检验规程 发芽试验》。黑麦草种子用0.3%的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 消毒12h,用蒸馏水洗净后挑选均一、形态正常的种子置于铺3层滤纸的培养皿(直径15cm)中,每皿100粒,设置3个重复。MC-LR处理浓度分别为

0.04、0.08、0.4、0.8和 $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,以蒸馏水作为对照(CK)。光照时间12h,温度 $25\text{ }^\circ\text{C}\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ 。第1d向各培养皿中加入15mL不同浓度的藻毒素和蒸馏水,使滤纸完全浸湿,每日补充等量蒸发掉的溶液以保持滤纸湿润。处理7d后,将其收获,用于生理生化指标测定。

#### 1.2.3 发芽率、鲜重、干重、株高和根长测定

第7d统计发芽种子数并计算发芽率。其计算公式如下:

发芽率(%)=(发芽种子粒数/供试种子数) $\times 100$

试验结束后,每皿随机挑取6棵生长状况较一致的幼苗测量其株高、根长和鲜重,并将每株幼苗65℃烘干至恒重,然后测其干重。

#### 1.2.4 抗氧化酶活性测定

酶的提取参照Xue等<sup>[14]</sup>的方法,取幼苗根上部分0.5~1.0g,加入5mL预冷的 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH=7.8磷酸缓冲液,在冰浴上研磨成浆, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下 $10\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心20min,上清液即为酶液。超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定采用氮蓝四唑(NBT)光化还原法测定<sup>[15]</sup>,以抑制NBT光化学还原的50%为1U。过氧化物酶(POD)活性采用愈创木酚法测定<sup>[16]</sup>,过氧化氢酶(CAT)活性采用过氧化氢法测定<sup>[15]</sup>。蛋白质含量采用考马斯亮蓝法<sup>[15]</sup>。

利用EXCEL和SPSS生物统计软件进行相关数据分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 MC-LR对黑麦草种子发芽率和幼苗生长的影响

由表1可知,MC-LR处理对黑麦草种子发芽率具有一定抑制作用,随着MC-LR浓度的升高发芽率逐渐降低,从 $0.08\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理开始,种子发芽率比对照显著降低, $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理的种子发芽率是对照的80.5%。MC-LR对黑麦草幼苗株高影响较小,各组之间无显著差异。最高浓度MC-LR处理对幼苗根部伸长具有显著抑制作用,与对照相比抑制率为23.7%。不同浓度MC-LR对单株幼苗干重无显著影响,对于幼苗鲜重除浓度为 $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的处理比对照显著降低了23.1%,其他处理组对鲜重无显著影响。研究结果显示,最高浓度的MC-LR处理显著抑制了黑麦草幼苗根部伸长和鲜重,这可能由于当黑麦草幼苗根部伸长受到抑制时,其对养分的吸收也受到影响,从而使幼苗鲜重降低。

### 2.2 MC-LR对黑麦草幼苗抗氧化酶活性的影响

不同浓度MC-LR对SOD、POD和CAT活性的

表 1 不同浓度 MC-LR 对黑麦草发芽率、株高、根长和生物量的影响

Table 1 Effects of different concentrations of MC-LR on germination percentage, seedling height, root length and biomass

MC-LR 浓度 concentration of MC-LR/mg·L <sup>-1</sup>	发芽率 germination percentage/%	株高 seedling height/cm	根长 root length/cm	鲜重 fresh weight/mg	干重 dry weight/mg
0	95.67±1.15c	6.71±0.20a	6.62±0.41b	22.2±2.43b	4.75±0.84a
0.04	93.00±3.00bc	7.12±0.73a	6.62±0.56b	20.33±3.83ab	4.09±1.09a
0.08	89.67±3.51b	6.58±0.77a	6.45±0.39b	20.87±2.41ab	4.27±0.79a
0.4	89.33±2.52b	6.64±0.81a	6.32±0.34b	19.47±1.63ab	4.02±0.84a
0.8	87.67±3.21b	7.00±0.46a	6.19±0.34b	18.07±1.33ab	3.43±0.39a
4	77.00±4.36a	6.40±0.45a	5.05±0.42a	17.07±1.67a	3.88±0.60a

注 统计检验在 5% 水平,用于不同处理内进行比较,不同字母代表差异显著。

Different letters following the numbers mean the significance at 5% level, which was used to compare the different treatments.

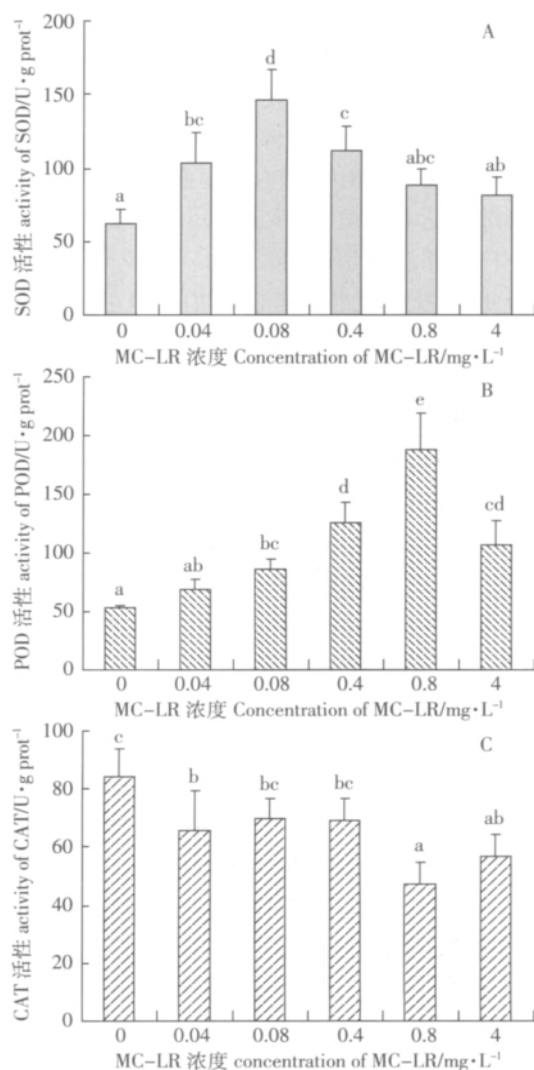
影响如图 1 所示。随着 MC-LR 浓度升高, SOD 活性(图 1-A)先升高后降低, 对照组 SOD 活性最低, 当 MC-LR 浓度为 0.08 mg·L<sup>-1</sup> 时, SOD 酶活性最强, 与其他各组相比差异显著; MC-LR 浓度为 0~0.8 mg·L<sup>-1</sup> 时, POD 活性(图 1-B)逐渐升高, MC-LR 最高浓度处理的 POD 酶活性比 0.8 mg·L<sup>-1</sup> 处理显著下降; 对照组 CAT(图 1-C)活性最高, MC-LR 浓度为 0.8 mg·L<sup>-1</sup> 时, CAT 活性最低。随着 MC-LR 浓度的上升, SOD 和 POD 活性均呈先上升后降低的趋势, 这说明 MC-LR 处理提高了黑麦草幼苗体内这两种抗氧化酶活性, 但高浓度 MC-LR 对两种酶活性又具有一定抑制作用。

### 2.3 MC-LR 在黑麦草幼苗体内的积累

随着 MC-LR 处理浓度的升高, 黑麦草幼苗体内积累的 MC-LR 含量也逐渐升高。本试验方法下当 MC-LR 浓度为 0.04 mg·L<sup>-1</sup> 时未检测到黑麦草幼苗体内 MC-LR 的积累。当 MC-LR 浓度为 4 mg·L<sup>-1</sup> 时, 幼苗体内积累的 MC-LR 含量最高, 与其他各组相比差异显著, 分别是 0.08、0.4 和 0.8 mg·L<sup>-1</sup> 处理的 131.6、11.1 和 6.2 倍。MC-LR 浓度为 0.8 mg·L<sup>-1</sup> 的处理, 幼苗体内积累含量是 0.08 mg·L<sup>-1</sup> 处理的 21.2 倍。除 0.8 mg·L<sup>-1</sup> 的处理, 黑麦草幼苗对 MC-LR 的生物积累系数(BCF)均随着 MC-LR 处理浓度的升高而增大。MC-LR 浓度为 4 mg·L<sup>-1</sup> 处理的 BCF 是 0.08 和 0.4 mg·L<sup>-1</sup> 处理的 2.7 和 1.1 倍(表 2)。

## 3 讨论

近几十年来蓝藻水华事件频繁发生, 用含有 MCs 的湖水灌溉农作物、用蓝藻发酵产物作肥料以及未经任何处理大量蓝藻的堆积, 都可能会使 MCs 与种植的农作物相接触并有可能在作物体内积累, 从而通过食物链途径对人类食品安全造成一定潜在风险。Crush



统计检验在 5% 水平,用于不同处理内进行比较,不同字母代表差异显著。

Different letters following the numbers mean the significance at 5% level, which was used to compare the different treatments.

图 1 不同浓度 MC-LR 对青菜幼苗 SOD、POD 和 CAT 活性的影响  
Figure 1 Effects of MC-LR on the ability of SOD, POD and CAT of Chinese cabbage seedlings



表 2 MC-LR 在黑麦草幼苗体内的积累  
Table 2 Accumination of MC-LR in ryegrass seedlings

MC-LR 浓度 concentration of MC-LR/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	MC-LR 含量 content of MC-LR/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ FW	生物积累系数(BCF) bioconcentration factor
0	0	—
0.04	0	—
0.08	0.30±0.014a	3.71±0.17a
0.4	3.56±0.14ab	8.90±0.36bc
0.8	6.37±0.87b	7.97±1.08b
4	39.48±4.11c	9.87±1.03c

统计检验在 5% 水平,用于不同处理内进行比较,不同字母代表差异显著。

Different letters following the numbers mean the significance at 5% level, which was used to compare the different treatments.

等<sup>[17]</sup>用含多种藻毒素异构体总浓度为  $2.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的湖水分别以灌根和喷叶两种方式灌溉黑麦草、三叶草、生菜和油菜这 4 种植物,一定时间后检测到 MCs 在黑麦草体内积累浓度超过相关指标。Chen 等<sup>[18]</sup>用不同浓度 MCs 粗提液处理水稻和油菜幼苗 10 d,结果显示较高浓度 MCs 对水稻和油菜幼苗株高以及水稻根长都有显著抑制作用,并用 ELISA 法检测到 MCs 在水稻和油菜幼苗体内的积累。本试验结果显示,随着 MC-LR 处理浓度升高,黑麦草幼苗积累的 MC-LR 含量也逐渐升高,且浓度越高黑麦草幼苗的生物富集系数越高,说明黑麦草可能对 MC-LR 具有一定积累能力。

当植物遭受逆境胁迫时,活性氧(reactive oxygen species ROS)在体内积累,损伤细胞结构与功能,SOD、POD 和 CAT 是清除活性氧抗氧化保护酶防御系统的主要成员<sup>[19]</sup>。试验中一定浓度 MC-LR 处理提高了黑麦草幼苗体内 SOD 和 POD 活性,这与 Chen 等<sup>[18]</sup>的报道相一致,但当 MC-LR 浓度较高时,SOD 酶和 POD 酶活性受到抑制,同时当 MC-LR 浓度为  $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,黑麦草幼苗的根长和鲜重与对照相比显著降低(表 1),这有可能说明高浓度 MC-LR 可通过抑制抗氧化酶活性对黑麦草幼苗的生长造成一定程度抑制作用。

本文仅对藻毒素粗提液中不同浓度 MC-LR 在黑麦草幼苗的积累情况进行了研究,有关不同存在形式的 MCs 如含 MCs 湖水、新鲜藻液以及蓝藻发酵沼渣等对不同农作物不同生长期生长状况的影响以及 MCs 在植物体内的积累规律,还需要进一步研究和探讨。

#### 参考文献:

[1] MacKintosh C, Beattie K A, Klumpp S, et al. Cyanobacterial micro-

cystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants[J]. *FEBS Lett*, 1990, 264 : 187-192.

[2] Hastie C J, Borthwick E B, Morrison L F, et al. Inhibition of several protein phosphatases by a non-covalently interacting microcystin and a novel cyanobacterial peptide, nostocyclin[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1726 :187-193.

[3] Hesse K, Dittmanna E, Bömer T. Consequences of impaired microcystin production for light-dependent growth and pigmentation of microcystins aeruginosa PCC 7806[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2001, 37(1) :39-43.

[4] 张维昊, 徐小青. 固相萃取高效液相色谱法测定水中痕量微囊藻毒素[J]. 分析化学, 2001, 19(5) :522-525.

ZHANG Wei-hao, XU Xiao-qing. Determination of trace level microcystins in water using solid-phase extraction and high performance liquid chromatography[J]. *J Anal Chem*, 2001, 19(5) :522-525.

[5] 盛建武, 何苗, 施汉昌, 等. 水环境中微囊藻毒素检测技术研究进展[J]. 环境污染与防治, 2006, 28 :132-136.

SHENG Jian-wu, HE Miao, SHI Han-chang, et al. Review on detection technologies of microcystins in aquatic environment[J]. *Chin Environ Pollut Control*, 2006, 28 :132-136.

[6] World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality[M]. third ed. Geneva, 2004 :195.

[7] Dawson R M. The toxicology of microcystins[J]. *Toxicon*, 1998, 36 :953-962.

[8] Yoshitla T, Makita Y, Nagata S, et al. Acute oral toxicity of microcystin-LR, A cyanobacterial hepatotoxin in mice[J]. *Nat Toxins*, 1997, 5 :91-95.

[9] Li X Y, Lu Y D, Song L R, et al. Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR[J]. *Toxicon*, 2003, 42 :85-89.

[10] Kós P, Gorzó G, Surányi G, et al. Simple and efficient method for isolation and measurement of cyanobacterial hepatotoxins by plant tests (*Sinapis alba* L.)[J]. *Anal Biochem*, 1995, 225, 49-53.

[11] Peuthert A, Chakrabarti S, Pflugmacher S. Uptake of microcystins-LR and -LF(Cyanobacterial Toxins)in seedlings of several important agricultural plant species and the correlation with cellular damage(lipid peroxidation)[J]. *Environ Toxicol*, 2007, 22(4) :436-442.

[12] 李慧明, 薛延丰, 易能, 等. 藻毒素对青菜生长的影响及在幼苗体内的积累[J]. 江苏农业学报, 2009, 25(3) :680-684.

LI Hui-ming, XUE Yan-feng, YI Neng, et al. Effects of microcystins on the growth of Chinese cabbage(*B. chinensis* L.)and the accumulation of microcystins in seedlings [J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2009, 25(3) :680-684.

[13] Cong L M, Huang B F, Chen Q, et al. Determination of trace amount of microcystins in water samples using liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 569 :157-168.

[14] Xue Y F, Liu L, Liu Z P, et al. Protective role of Ca against NaCl toxicity in Jerusalem artichoke by up-regulation of antioxidant enzymes[J]. *Pedosphere*, 2008, 18(6) :766-774.

[15] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 北京高等教育出版社, 2000 :164-165, 167-169, 182-184.

- LI He-sheng. Principles and techniques of plant physiological bio-chemical experiment[M]. Beijing :Higher Education Press, 2000 :164-165, 167-169, 182-184.
- [16] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 第三版. 北京 :高等教育出版社, 2003 :121-124, 274-277.
- ZHANG Zhi-liang. The experimental guide for plant physiology [M]. (third edition) Beijing :Higher Education Press, 2003 :121-124, 274-277.
- [17] Crush J R, Briggs L R, Sprosen J M, et al. Effect of irrigation with lake water containing microcystins on microcystin content and growth of ryegrass, clover, rape, and lettuce[J]. *Environ Toxicol*, 2008, 23(2) : 246-252.
- [18] Chen J S, Dai J, Gan N, 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 :393-400.
- [19] 李合生. 现代植物生理学 [M]. 第二版. 北京 :高等教育出版社, 2006 :334.
- LI He-sheng. Modern plant physiology[M]. (second edition) Beijing : Higher Education Press, 2006 :334.

## 欢迎订阅 2010 年《农业环境科学学报》

《农业环境科学学报》是由农业部主管、农业部环境保护科研监测所、中国农业生态环境保护协会主办的全国性学术期刊,为中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国科学引文数据库核心期刊,列于被引频次最高的中国科技期刊 100 名之内并入选《中国学术期刊(光盘版)》。本刊被国外多家著名检索机构收录,如美国《化学文摘》(CA)和俄罗斯《文摘杂志》(AJ),美国《剑桥科学文摘社网站》、水系统、水科学与渔业文摘、环境工程、水资源文摘及环境科学与污染管理等 7 种国际检索系统列为来源期刊。本刊主要刊登农业生态环境科学领域具有创新性的研究成果,包括新理论、新技术和新方法。读者对象为从事农业科学、环境科学、林业科学、生态学、医学和资源保护等领域的科技人员和院校师生。

《农业环境科学学报》为月刊,大 16 开,224 页,每本定价 40.00 元,全年定价 480.00 元。国内外公开发行,全国各地邮局征订,邮发代号 6-64。如读者在当地邮局漏订,可通过邮局汇款至本刊编辑部补订。此外,编辑部存有过刊的各卷合订本,欢迎选购。

编辑部地址:天津市南开区复康路 31 号

电话 (022)23674336,23006209

电子信箱 xaep@vip.163.com

邮政编码 300191

传真 (022)23006209

网址 www.aes.org.cn