

刘碧波, 吴 焯, 耿俊杰, 等. 微囊藻毒素对水稻、高粱和玉米毒性的研究[J]. 江苏农业科学 2012, 40(5): 258-261.

微囊藻毒素对水稻、高粱和玉米毒性的研究

刘碧波¹, 吴 焯¹, 耿俊杰¹, 刘剑彤²

(1. 河南工程学院资源与环境工程系, 河南郑州 451191; 2. 中国科学院水生生物研究所, 湖北武汉 430072)

摘要: 以水稻、高粱和玉米为研究对象, 考察了微囊藻毒素对受试作物的毒性差异, 研究了不同浓度 MC 对萌发及萌发初期生长发育的影响, 不同灌溉时期对受试作物生长发育的影响, 检测指标包括发芽率、株高、鲜重、叶绿素、根系活力等。结果表明, 受试作物对微囊藻毒素毒性并不一致, 水稻发芽率受到明显抑制, 高粱发芽率基本不受影响, 玉米出现了低浓度促进、高浓度抑制的现象; MC 对水稻、高粱和玉米的光合作用、株高和鲜重没有抑制作用, 反而有一定的促进效果; 不同灌溉时间条件下的研究表明, 萌发前对高粱和玉米染毒会明显抑制植株根系活力, 萌发结束后在染毒则对植株根系活力有明显的促进作用。

关键词: 微囊藻毒素; 毒性; 禾本科; 水稻; 玉米; 高粱

中图分类号: X505.231 文献标志码: A 文章编号: 1002-1302(2012)05-0258-04

微囊藻毒素是公认的肝毒素和促癌剂, 水体中微囊藻毒素主要是通过藻细胞破裂后释放出来, 长期暴露会对人的肝脏造成损伤, 极端情况下会危及到人的生命。研究表明, 微囊藻毒素随着灌溉用水进入农田之后可以在农田中滞留, 微囊藻毒素在完全降解之前仍然要在土壤中滞留一段时间, 这将对暴露在该环境下的作物带来不利影响^[1-2]。

微囊藻毒素对于植物的生长、形态、叶绿素含量等都会产生影响, 主要表现在幼苗发生变形、重量减少、侧根减少、叶片的光合作用率减少等方面^[3-4]。研究发现, 微囊藻毒素能强烈抑制植物中蛋白磷酸酶 1 和 2A, 影响营养物质的吸收、迁移及根韧皮部的功能, 影响茎叶的生长^[4-5]。Codd 等发现用含有铜绿微囊藻的水浇灌莴苣后, 叶片上可残留微囊藻毒素及铜绿微囊藻体, 不能通过水洗去除, 由此引起人们对微囊藻毒素农业安全问题的关注^[6]。由于溶解性微囊藻毒素在天然水环境中的质量浓度超过 10 $\mu\text{g/L}$ 的情况比较少见, 目前

研究者主要对低浓度下微囊藻毒素对农作物的影响进行研究, 研究的作物主要为蔬菜, 对粮食作物和牧草也开展了研究。不同作物的耐受性具有差异, 马铃薯、菠菜和小麦对微囊藻毒素比较敏感, 在 MC-LR 为 5 $\mu\text{g/L}$ 时种子萌发、根和幼苗生长、光合作用和酶活性受到明显抑制^[7-8]。而甘蓝型油菜和稻则表现出较强的耐受性, 在质量浓度为 24 $\mu\text{g/L}$ 的多种微囊藻毒素存在下, 种子萌发和酶活性几乎不受影响^[9]。在 MC-LR 为 10 $\mu\text{g/L}$ 时, 家独行菜的根、叶和鲜重显著减少, 而花茎甘蓝仅表现出轻微生长抑制^[10]。在含多种微囊藻毒素的湖水灌溉下, 莴苣表现出明显的生长抑制, 三叶草则没有表现出明显的生长抑制^[11]。虽然微囊藻毒素对陆生植物存在毒害作用已经被普遍确认, 但是也有研究表明低质量浓度 (<10 $\mu\text{g/L}$) 的 MC-RR 能促进油菜和白菜的生长, 高质量浓度 (>100 $\mu\text{g/L}$) 的 MC-RR 才会抑制生长, 并且抑制作用与植株暴露的时期和持续时间密切相关^[1]。

研究资料表明, 微囊藻毒素确实存在对植物的毒性作用, 而且随着灌溉用水进入农田之后也能导致植物抗氧化系统损伤和形态学上的变化。具体的毒性效应较为复杂, 不同结构的微囊藻毒素表现出一定的毒性差异, 植物种类和生长阶段不同对微囊藻毒素的敏感性也有差异。我国的滇池、巢湖、太湖等地区, 由于湖泊富营养化严重, 有大量的微囊藻毒素随着农业灌溉用水进入农田, 目前, 虽然已经对水稻、菠菜、莴苣、油菜、白菜等在微囊藻毒素暴露下的相关毒理进行了研究, 但

收稿日期: 2011-10-13

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项(编号: 2009ZX07104-005-03、2009ZX07102-003-004、2008ZX07101-007); 中国科学院水生生物研究所开放性实验室项目(编号: 2009FBZ09); 河南工程学院博士基金(编号: D09010)。

作者简介: 刘碧波(1978—), 男, 湖北仙桃人, 博士, 讲师, 主要研究方向为有机污染物毒理学及水体污染修复技术。E-mail: liubb2008@126.com。

(上接第 257 页)

身长、尾长、体温、心率和血压) 均未见异常。

参考文献:

- [1] 朱佳廷, 冯 敏, 哈益明, 等. 宠物食品辐照灭菌及工艺剂量研究[J]. 核农学报 2009, 23(2): 279-284.
- [2] 高美须, 王春雷, 裴 颖, 等. 国外食品辐照标准的制定实施经验及借鉴[J]. 农产品质量与安全 2010(4): 57-60.
- [3] 林红英, 朱佳廷, 冯 敏, 等. 宠物干粮食品辐照杀菌工艺参数的确定[J]. 核农学报 2009, 23(1): 98-101.

- [4] 刘春泉, 哈益明, 朱佳廷, 等. 饲料辐照杀菌技术规范的研究[J]. 江苏农业科学 2006(4): 97-100.
- [5] 林 琴, 张同成, 刘清芳, 等. 宠物饲料辐照保鲜技术的研究[J]. 苏州大学学报: 医学版 2002, 22(1): 38-39.
- [6] 哈益明. 辐照食品及其安全性[M]. 北京: 化学工业出版社 2006.
- [7] 严建民, 高美须, 冯 敏, 等. 辐照食品的卫生安全性研究现状[J]. 核农学报 2010, 24(1): 88-92.
- [8] 朱佳廷, 刘春泉, 冯 敏. 中国辐照饲料现状及发展对策[J]. 核农学报 2007, 21(1): 65-69.

是从已有的研究报道看来,不同作物对微囊藻毒素的耐受度和响应情况并不一致,还没有研究报道对此给出明确地解释。本试验以主要粮食作物水稻、玉米、高粱为研究对象,系统研究微囊藻毒素对受试作物的毒性,以期为寻找农业生产上采用合理的应对措施提供理论支持,保证农产品安全,避免危及人畜健康。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 作物为水稻、玉米、高粱,所有受试种子都从河南豫研种子科技有限公司购买。干藻粉由中国科学院水生生物研究所滇池工作站提供, -20°C 冷藏备用。为了模拟野外情况,试验中使用的是 MC 初提液,其中 MC-RR 含量最高,浓度标示都是指 MC-RR 浓度。培养液使用日本园试配方,所用药品纯度均为分析纯。

1.1.2 MC 的提取 称取一定量干藻粉,按 20 mL/g 的比例加入 75% 甲醇作为提取液^[12],室温下置于搅拌器上搅拌 1 h,取出后以 3 000 r/min 的转速离心 10 min,取出上清液。按此步骤重复提取 2 次,并将 3 次提取的上层清液合并,旋转蒸发除去甲醇,测定浓度后保存(主要 MC 异构体是 MC-RR)待用^[1]。

1.2 试验方法

1.2.1 萌发试验 萌发试验的方法主要参考文献[9]。MC-RR 浓度梯度为 0、1、10、100、1 000 $\mu\text{g/L}$ 。对照组使用蒸馏水。所有萌发试验都在培养皿(直径 90 mm)中进行,在培养皿底部垫 4 层纱布,试验开始时 30 mL 不同浓度的 MC 溶液加入到培养皿中使纱布湿润,种子置于纱布上面,每天加入 15 mL 相应浓度的 MC 溶液,使纱布保持湿润,直至试验结束。试验温度维持在 25°C 左右,光照时间为 12 h-12 h。

所有试验均设置 3 组平行,试验期间每天观测种子发芽率,株高在试验结束 7 d 后测定。

1.2.2 不同灌溉时间条件下 MC 对不同作物生长发育的影响 根据 MC 在农田中的残留时间^[1],灌溉周期被设定为 7 d。灌溉时间被设定为萌发前、萌发结束、萌发结束后 5 d。在设定时间内使用 1 000 $\mu\text{g/L}$ MC-RR 溶液对不同试验组进行灌溉,其他时段以及对照使用蒸馏水灌溉。

所有试验均设置 3 组平行,20 d 之后对各试验组的株高、鲜重、叶绿素和根系活力(TTC)进行测定。

1.2.3 MC 分析及 HPLC 系统 半制备型 HPLC 系统: Waters 600 型高效液相色谱仪,由控制器、四元梯度泵组成的输液系统和 2487 双波长紫外/可见检测器组成,分析柱: BDS Hyper-sil C_{18} (4.6 \times 250 mm);柱温为 25°C ;流动相: 甲醇:水(含 0.05% TFA) = 62:38;流动相流速为 1 mL/min;进样量为 20 μL ^[12]。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 MC-RR 对不同作物发芽率和株高的影响

在 7 d 萌发试验中,3 种作物发芽率最低的都是 1 000 $\mu\text{g/L}$ 的染毒组,表明 3 种作物在浓度为 1 000 $\mu\text{g/L}$ MC 染毒条件下,萌发过程都受到了明显的抑制。水稻和高粱最终发芽最高的都是对照处理,表明水稻和高粱在不同浓

度 MC 条件下萌发都受到抑制,水稻发芽率变化幅度最大,高粱发芽率变化幅度较小。玉米最终发芽率最高的是 1 $\mu\text{g/L}$ 组和 10 $\mu\text{g/L}$ 组,包括 100 $\mu\text{g/L}$ 组的最终发芽率都高于对照组,表明玉米在浓度低于 100 $\mu\text{g/L}$ 的 MC 染毒条件下萌发并没有受到抑制,反而有一定的促进作用(表 1)。

表 1 不同 MC 浓度条件下主要农作物的发芽率比较

MC 浓度 ($\mu\text{g/L}$)	发芽率(%)		
	水稻	高粱	玉米
0(对照)	95.00	96.00	80.00
1	88.00	94.67	86.67
10	92.00	94.67	86.67
100	89.33	92.67	84.44
1 000	84.67	91.33	78.78

水稻各染毒组的平均株高都高于对照组,株高 t 测验结果表明,1 $\mu\text{g/L}$ 组与对照组、10 $\mu\text{g/L}$ 组和 1 000 $\mu\text{g/L}$ 组之间都存在显著性差异;10 $\mu\text{g/L}$ 组与 1 $\mu\text{g/L}$ 组、100 $\mu\text{g/L}$ 组、1 000 $\mu\text{g/L}$ 组之间均存在显著差异;100 $\mu\text{g/L}$ 组与对照组之间也有显著性差异(图 1)。结合发芽率和株高水稻萌发各组株高关系如下:1 $\mu\text{g/L}$ 组 > 100 $\mu\text{g/L}$ 组 > 1 000 $\mu\text{g/L}$ 组 > 对照组 > 10 $\mu\text{g/L}$ 组。玉米株高结果表明,10 $\mu\text{g/L}$ 组与 100 $\mu\text{g/L}$ 组平均株高高于对照组, t 测验结果也表明,2 组株高与对照组、1 $\mu\text{g/L}$ 组、1 000 $\mu\text{g/L}$ 组之间有显著性差异。高粱组平均株高差别不大,各组间差异不显著。

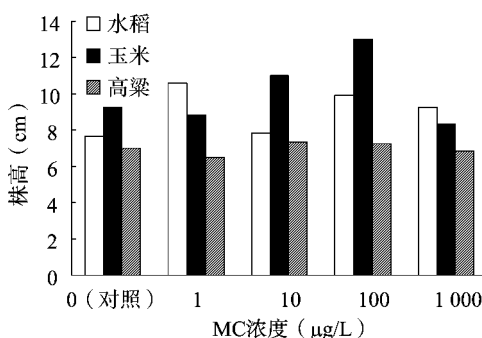
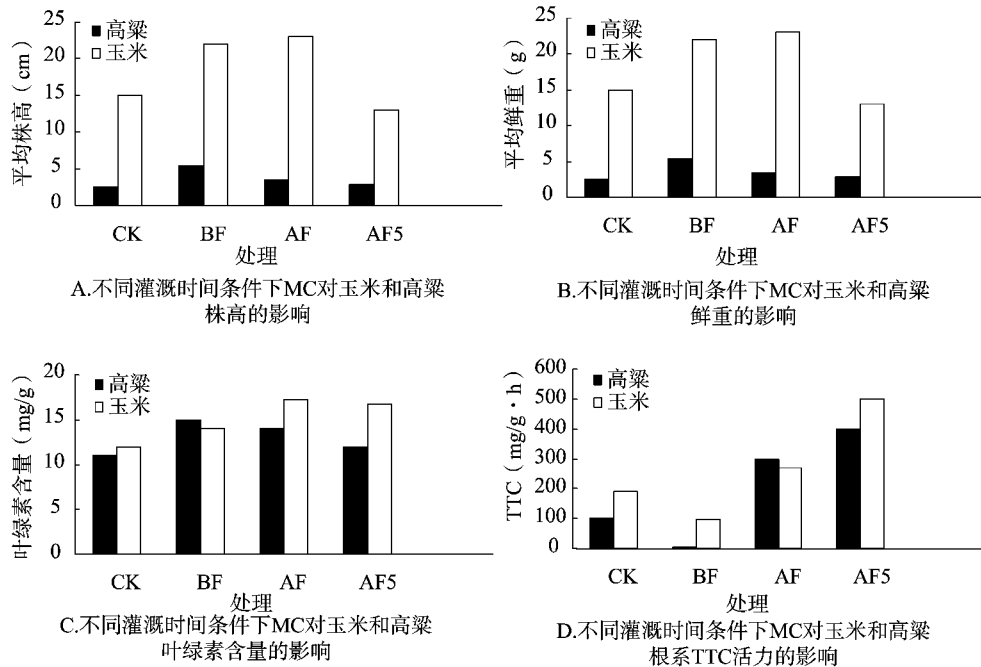


图 1 不同浓度 MC 对禾本科典型农作物株高的影响

2.2 不同灌溉时间条件下 MC-RR 对不同作物生长发育的影响

由图 2 可见,在不同灌溉时间条件下,高粱各染毒组平均株高都高于对照组, t 测验结果显示,对照组与其他各组株高存在显著性差异。萌发前后灌溉 2 组玉米平均株高明显高于其他 2 组, t 测验也表明对照组和萌发结束后 5 d 组与其他 2 组之间株高有显著性差异。平均鲜重的数据与平均株高变化情况相似,高粱的对照组鲜重明显低于其他组,玉米的萌发前和萌发结束 2 组的鲜重明显高于其他 2 组。高粱和玉米的叶绿素含量随着灌溉时间的推迟都呈现先升高后降低的趋势,染毒组都高于对照组,不同之处是高粱叶绿素含量最高的是萌发前灌溉组,玉米叶绿素含量最高的是萌发后灌溉组。TTC 的变化与叶绿素含量相反,随着灌溉时间的推迟出现了先降低后升高的趋势,高粱与玉米变化趋势基本一致,最低点都出现在萌发前灌溉组,最高点都出现在萌发结束后 5 d 灌溉组。



CK: 对照组, BF萌发前, AF萌发结束, AF5 萌发结束后5 d

图2 不同灌溉时间条件下MC对玉米和高粱生长发育的影响

3 讨论

3种作物萌发试验结果表明,在本试验设定的浓度范围内,MC对水稻毒性最强,高粱萌发受到一定的抑制作用,但不明显,玉米仅在浓度为1000 $\mu\text{g/L}$ 的MC染毒条件下才出现较弱的抑制作用,低浓度条件下还出现了促进作用。高浓度抑制低浓度促进的Homesis现象在油菜和白菜的研究中也有报道^[1]。诸多研究表明,微囊藻毒素暴露后,机体内抗氧化防御系统作出了积极的反应。体内主要存在两类系统:抗氧化系统,一类是酶抗氧化系统,包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)等;另一类是非酶抗氧化系统,包括维生素C、维生素E、谷胱甘肽(GSH)等^[13]。Ding等的研究也证实大鼠肝细胞中GSH水平时间剂量性改变,先上升后下降^[14]。而使用MC-RR暴露烟草BY-2悬浮细胞,GSH含量下降,GSSG含量上升。GSH/GSSG的值4 d内高于对照,而6 d后低于对照组^[15]。众多研究证实,细胞在微囊藻毒素的暴露下,SOD含量下降,表明抗氧化系统在抵抗毒性方面有着重要作用^[16-17]。也有研究认为在MCs暴露的48 h后,SOD的含量上升^[18],这种结论的差异可能是由于暴露时间的不同所引起的。暴露后短时间内,SOD为清除过多的ROS而大量表达,造成SOD的含量上升。随着时间的延长,SOD快速消耗使得其含量下降。CAT可以将体内的过氧化氢转化为水,也是重要的抗氧化酶。与SOD类似,MCs暴露后短时间内,CAT活性存在剂量依赖性提高^[19]。但在较长时间的观测下,CAT的活性出现下降^[17]。在MCs暴露后,GR的活力下降,GPX含量上升,表明细胞内ROS含量增加,细胞产生了氧化应激现象^[15,20]。在168 h后观测,GPX的活性恢复至正常水平^[18]。以上研究表明,生物体内抗氧化防御系统在低剂量或短时间MC暴露条

件会出现应激反应来降低MC对生物体的危害,当剂量或者时间超出一定范围之后抗氧化防御系统会受到损伤。

从本萌发和不同灌溉时间条件下的染毒试验结果来看,3种作物的株高并没有受到明显的抑制,部分试验组的株高还明显高于对照组。表明在本研究中MC在抑制农作物萌发的同时,对植株的株高并未产生明显的抑制作用。McElhiney等的研究表明,经过长达18 d暴露后,MC-LR对植物的生长并没有产生明显的影响^[7]。本研究的结果与其一致。

不同灌溉时间条件下染毒试验结果表明,在萌发前进行染毒对玉米和高粱的光合作用(叶绿素含量)、株高和鲜重都有促进作用,但是植株根系TTC活力受到抑制。而McElhiney等的研究表明,经过长达18 d暴露后,MC-LR对植物的生长并没有产生明显影响,但是根系发育受到了抑制,结果导致处理植株比对照组少吸收30%的培养基^[7]。本研究中玉米和高粱根系活力仅仅在萌发前染毒条件下才受到抑制,萌发结束和萌发结束后5 d染毒都有促进作用。表明植株根系在萌发开始至萌发结束阶段抗氧化系统不完善,不会产生应激反应,而萌发结束和萌发结束后5 d染毒时,植株根系抗氧化系统应激反应能力不断增强。

本研究没有对微囊藻毒素在主要禾本科农作物体内的积累量进行检测,前人研究表明,微囊藻毒素可在作物体内积累,含量高低受到灌溉水中微囊藻毒素含量、灌溉方式、作物种类的影响^[9]。灌溉水微囊藻毒素含量增加,作物中微囊藻毒素的含量也相应增加。Chen等将油菜幼苗暴露于24 $\mu\text{g/L}$ 的多种微囊藻毒素混合液中,10 d后测定新鲜幼苗中微囊藻毒素含量为2.61 $\mu\text{g/kg}$,当微囊藻毒素混合液浓度为3000 $\mu\text{g/kg}$ 时,10 d后新鲜幼苗中微囊藻毒素含量高达651 $\mu\text{g/kg}$ ^[9]。在同样的生长条件下,不同作物中微囊藻毒素含量不同。Peuthert等研究了11种农作物对微囊藻毒素的吸

收能力,暴露于质量浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 含 MC-LR 和 MC-LF (亮氨酸和苯丙氨酸占据 x、z 位的异构体) 的溶液中时,新鲜根部 MC-LR 的含量为 12~125 $\mu\text{g}/\text{kg}$,新鲜茎叶中 MC-LR 的含量为 4~44 $\mu\text{g}/\text{kg}$,其中小麦中的 MC-LR 的含量最高,其次是苜蓿^[8]。表明作物根部的微囊藻毒素含量高于茎叶部分,作物体内的微囊藻毒素主要是由根部吸收进入体内。虽然对于食用部分都在地上部的禾本科植物而言,MC 在果实中富集的风险相对较小,但在今后的研究中还应开展长期毒理试验,检测 MC 在禾本科作物果实中的积累情况,保障食品生产安全。

4 结论

在萌发试验中,MC 对主要农作物的毒性效应并不一致,其中对水稻毒性最强,高粱的萌发基本上不受影响,玉米萌发过程在低剂量 MC 条件下出现了明显的促进作用,仅在 1 000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 剂量条件下才出现轻微的抑制作用。本研究中 MC 并没有对水稻、高粱和玉米的光合作用、株高和鲜重产生抑制。在萌发前期进行染毒对农作物根系活力有较强的抑制作用,萌发结束后再染毒则会因应激反应而出现促进根系活力的现象。

参考文献:

- [1] Bibo L, Yan G, Bangding X, et al. A laboratory study on risk assessment of microcystin-RR in cropland [J]. *Journal of Environment Management* 2008, 86: 566-574.
- [2] Chen W, Song L R, Gall N Q, et al. Sorption, degradation and mobility of microcystins in Chinese agriculture soils: risk assessment for groundwater protection [J]. *Environmental Pollution* 2006, 144(3): 752-758.
- [3] Abe T, Lawson T, Weyers J B, et al. Microcystin-LR inhibits photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* primary leaves: implications for current spray irrigation practice [J]. *New Phytol* 1996, 133: 651-658.
- [4] Kurki-Helasma K, Meriluoto J. Microcystin uptake inhibits growth and protein phosphatase activity in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings [J]. *Toxicol* 1998, 36: 1921-1926.
- [5] MacKintosh C, Beattie K A, Klumpp S, et al. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants [J]. *FEBS Lett* 1990, 264(2): 187-192.
- [6] 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]. *Toxicol* 1999, 37(8): 1181-1185.
- [7] McElhiney J, Lawton L A, Leifert C. Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth and the toxicity of plant tissues following exposure [J]. *Toxicol* 2001, 39: 1411-1420.
- [8] Pflugmacher S, Aulhorn M, Grimm B. 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.
- [9] Chen J, Song L, Dai J, 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]. *Toxicol* 2004, 43(4): 393-400.
- [10] Gehringer M M. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response [J]. *FEBS Letters* 2004, 557: 1-8, 36.
- [11] 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: 246-252.
- [12] Chen X G, Xiao B D, Liu J T, et al. Kinetics of the oxidation of MCRR by potassium permanganate [J]. *Toxicol* 2005, 45: 911-917.
- [13] 朱枫, 钱晨, 卢彦. 微囊藻毒素诱导细胞氧化胁迫的研究进展 [J]. *生态毒理学报* 2010, 5(6): 769-775.
- [14] Ding W X, Shen H M, Ong C N. Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition in microcystin-induced rapid apoptosis in rat hepatocytes [J]. *Hepatology* 2000, 32(3): 547-555.
- [15] Huang W N, Xing W, Li D H, et al. The role of glutathione metabolism in tolerance of tobacco BY-2 suspension cells to microcystin-RR [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2008, 80(3): 215-219.
- [16] Anja P, Shumon C, Stephan P. Uptake of microcystins-LR and LF (cyanobacterial toxins) in seedlings of several important agricultural plant species and the correlation with cellular damage [J]. *Environmental Toxicology* 2007, 22: 436-442.
- [17] Jayaraj R, Anand T, Rao P V. Activity and gene expression profile of certain antioxidant enzymes to microcystin-LR induced oxidative stress in mice [J]. *Toxicology* 2006, 220(2/3): 136-146.
- [18] Yin L Y, Huang J Q, Huang W M, et al. Responses of antioxidant system in *Arabidopsis thaliana* suspension cells to the toxicity of microcystin-RR [J]. *Toxicol* 2005, 46(8): 859-864.
- [19] Sampson J B, Beckman J S. Hydrogen peroxide damages the zinc-binding site of zinc Cu, Zn superoxide dismutase [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2001, 392: 8-13.
- [20] Yang C Y, Wang W B, Li D H, et al. Growth and antioxidant system of *Escherichia coli* in response to microcystin-RR [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 2008, 81(5): 427-431.