

微囊藻毒素在单波长紫外光照射下的光降解动态研究

陈 伟 甘南琴 宋立荣*

(中国科学院水生生物研究所 武汉 430072)

摘要 研究了两种微囊藻毒素在两种紫外光照射下的光降解行为, 研究结果表明: UV-C 是降解微囊藻毒素较好的光源; 光照强度是影响毒素降解重要的因素, 其次是温度和酸度; 在 UV-C 的照射下, 水体腐殖质对光降解具有抑制作用; 微囊藻毒素的光解反应符合准一级动力学模型. 同时本工作还按实际环境水体中毒素的含量水平进行了模拟研究, 发现紫外光 UV-C 对环境水体中低含量的微囊藻毒素具有很强的去除能力. 为今后发展无毒、高效、经济实用的饮用水处理技术做了有益的探索.

关键词 微囊藻毒素, 光降解, 腐殖酸, 动力学, 异构化, 紫外光照射

Photodegradation Dynamics of Pure Microcystin Variants with Illumination of Fixed Wavelength UV-lights

CHEN, Wei GAN, Nan-Qin SONG, Li-Rong*

(Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract Photolysis of microcystins by UV irradiation and the effects of different environmental factors on efficiency of UV degradation were studied. The results indicated that the rates of the photolytical degradation reactions of microcystin-LR and RR follow pseudo-first-order kinetic process. The results also showed that the concentrations of two microcystin variants decreased significantly by UV-C irradiation; the wavelength and intensity of UV irradiation are two very important factors affecting the rate of degradation; temperature and pH value could also affect the half life of degradation rates. When irradiated by weaker UV-light, isomerization could be detected in the course of photolytical degradation. The concentrations of two isomers transformed from microcystin-LR reached its maximum at the third minute and decreased with the time afterwards. To simulate photolysis of microcystins in the field water body, microcystins with low concentration were used. It was found that UV-C illumination was capable of decomposing over 95% of microcystins within 40 min. In the presence of humic substances the photodecomposition slowed down to a certain extent. These results are valuable in using UV irradiation for elimination microcystins from raw water.

Keywords microcystin, photodegradation, humic acid, kinetic, isomerization, UV irradiation

微囊藻毒素 (Microcystins, 以下简称 MC) 是一类由水华蓝藻中的微囊藻、鱼腥藻、颤藻等种类代谢产生的七环肽^[1,2] (图 1). 它对蛋白磷酸酶 1 和 2A 具有很强的抑制作用, 并且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^[3,4]. 微囊藻毒素对人类的最大危害是通过饮用水直接进入人体内, 然后在肝脏中富集. 肝

脏经 MC 长期低剂量暴露后, 发生癌变^[5]. 随着淡水水体富营养化的日益加剧、蓝藻的大量生长、水华的频繁暴发, 毒素毒害人畜的事件^[6] 接连发生, 藻毒素的研究已经引起了各国的普遍关注^[2]. 为此, 世界卫生组织 (WHO) 还专门成立专家组制定了饮用水微囊藻毒素的控制标准.

* E-mail: lrsong@ihb.ac.cn

Received March 13, 2003; revised July 14, 2003; accepted September 24, 2003.

中国科学院知识创新工程重大项目 (No. KSCX2-1-10) 国家重点基础研究发展规划项目 (No. 2002CB412300), 国家高技术发展计划 863 计划 (No. 2001AA641030) 和中国科学院水生生物研究所创新领域前沿资助项目.

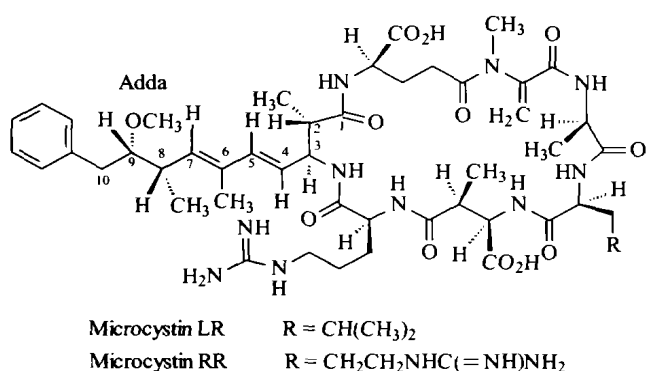


图1 微囊藻毒素的结构

Figure 1 Structure of microcystin

现有的毒素去除方法主要有:活性炭物理吸附、化学氧化剂氧化等^[1,5],但上述方法在使用时存在许多弊端,如:活性炭吸附去除效率较低,且费用极其昂贵,化学氧化剂(如氯气、二氧化氯等)氧化法容易产生致癌物质^[7],造成二次污染。紫外光照射去除毒素则克服了上述缺点,特别以其较高的环境安全性倍受青睐。国内已有关于毒素光降解的报道^[8],但由于实验材料(干藻粉提取液)和光源(非单波长紫外灭菌灯)的限制,上述文献只对毒素光降解的现象作了初步的研究。本工作选取两种毒性较大的微囊藻毒素(MC-LR和MC-RR,结构见图1),对其在单波长紫外光的照射下各种影响降解的环境因子作了较为深入的研究;同时还分析了毒素的降解过程,并模拟了自然水体中毒素在紫外光照射下的去除情况。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

色谱纯甲醇(Fisher); 500 mg, 6 mL Sep-park 固相萃取柱(Waters); 40~60 μm ODS 填料(Merck); 500 mg, 6 mL Sep-park PS-II 固相萃取柱(Waters); 超纯水取自 Mili-Q 超纯水发生器;微囊藻毒素混合标样(Kanto Reagents, Japan); 腐殖酸(Sigma); MC-LR 单克隆抗体(日本东京理工大学 UENO 教授赠送); 96 孔酶标板(Costar); 天然湖水取自武汉东湖和中国科学院水生生物研究所关桥实验水池,经 0.22 μm 玻璃纤维滤膜过滤后使用。

1.2 仪器

LC-10A 高效液相色谱仪配有 UV-10A 检测器(岛津); 制备型高效液相色谱系统(Waters); 紫外灯 UV-B 312 nm 和 UV-C 254 nm (VL-330G CE, France), 照度计及探头(VLX-3W CE, France)(其波长经中南计量测试研究中心确认); 高效薄层层析板 HPTLC (Merck); 高速离心机(日立); 自制恒温水浴可调照度光降解装置; 真空冷冻干燥仪(Yamato, Japan); 酶标仪(Model 550, Bio-Rad)。

1.3 实验方法

1.3.1 微囊藻毒素纯品的制备

本工作微囊藻毒素纯品的制备在前人工作基础上^[9]进行了一些改进和完善。提取毒素所用的微囊藻来源于实验室大量培养的铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*), 具体纯化工艺流程如图 2 所示。所得毒素的纯度经 HPLC 和 HPTLC^[10]检测符合毒素标样的要求。

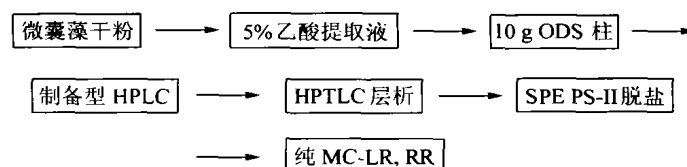


图2 微囊藻毒素纯化工艺流程

Figure 2 Purification procedure of microcystin-RR and LR

制备色谱条件: Waters ODS 半制备柱(10 mm × 250 mm), 检测波长 238 nm, 流动相为 55% 甲醇, 45% 磷酸缓冲液(0.05 mol/L KH₂PO₄, 20% H₃PO₄ 调节 pH = 3.0), 流速 4.0 mL/min, 进样量为 1 mL。

1.3.2 光降解实验

将制备的藻毒素纯品配制成不同浓度的溶液, 其中低浓度的溶液接近自然水体浓度水平, 溶液的浓度和纯度见表 1。分别取相同体积的溶液, 置于自制可调光强的恒温水浴装置中, 研究紫外光波长、光照强度、温度、pH 等因素对毒素降解的影响。

表1 毒素溶液的浓度和纯度

Table 1 Concentrations and purities of the microcystins

毒素溶液	浓度/(mg·mL ⁻¹)	纯度/%
MC-RR ₁	16.6	98.2
MC-RR ₂	17.5	98.2
MC-LR ¹	12.0	99.0
MC-LR ²	12.6	99.0

1.3.3 HPLC (High Performance Liquid Chromatography) 方法检测微囊藻毒素样品

所用色谱柱为岛津 ODS 柱(4.6 mm × 150 mm), 检测波长 238 nm, 流动相为 60% 甲醇, 40% 磷酸缓冲液(0.05 mol/L KH₂PO₄, 20% H₃PO₄ 调节 pH = 3.0), 流速为 1.0 mL/min, 进样量 10 μL。

1.3.4 IC ELISA^[11] (anti-immune complex ELISA) 检测微囊藻毒素样品

MC-LR 单克隆抗体包被 96 孔酶标板, 4 °C 过夜, 0.5% 明胶封闭, 37 °C 反应 2 h, 用 PBS-T 洗涤 3 次, 加入毒素标准品和样品 100 μL, 37 °C 静置 1 h, 每孔继续加入 100 μL 生物

素化的单克隆抗体,室温放置 2 h, PBS-T 洗涤 3 次,以 1:10000 稀释 HRP/Streptavidin(辣根酶标记链亲和素)加入每孔,室温反应 2 h,加底物 TMBZ 显色,30 min 后加 1 mol/L 的 H_2SO_4 终止反应,450 nm 波长测定吸光度 A_{450} ,绘制标准曲线,计算样品中 MC 的浓度.

1.3.5 降解中间产物跟踪实验

根据 HPLC 实验结果,用制备型 HPLC 分离毒素光降解中间产物,以 ELISA 方法进行测定.

2 结果与讨论

2.1 微囊藻毒素的光解动力学

有机污染物的光解反应一般符合准一级动力学模型^[12],本工作以微囊藻毒素的光降解实验数据用准一级反

应动力学模型进行回归拟合,在 $\alpha < 0.01$ 的水平下显著性较好.MC-LR 和 MC-RR 在不同环境因子作用下,用 UV-C 照射后的降解结果见表 2.

2.2 光源及环境因子对毒素光降解的影响

2.2.1 紫外光波长的影响

分别以 UV-B 和 UV-C 照射 MC-LR 和 MC-RR,研究结果表明:当所用光源为 UV-B 时,即使在光强度高达 3 mW/cm^2 的情况下,其半衰期也超过 20 h;而在 UV-C 的照射下几分钟就衰减一半.因此,紫外光波长是影响毒素光降解的最主要的因素.毒素在水溶液中的光降解过程可能是通过紫外光激发产生单线态的氧,后者的强氧化性将毒素的环状结构打开;在有机溶液中可能是由光化学反应产生的游离基来引发链式反应^[13],使得毒素发生降解.因此当紫外光照射毒素的水溶液时,紫外光的波长越短,其能量就越大,所产生单线态氧的浓度就越高,降解也就越快.

表 2 MC-LR 和 MC-RR 在不同环境因子影响下的实验结果^a

Table 2 Experimental results of MC-LR and MC-RR under different environmental factors

序号	光强度/($\text{mW} \cdot \text{cm}^{-2}$)	温度/ $^{\circ}\text{C}$	pH	准一级动力学方程	速率常数 k/min^{-1}	半衰期 $t_{1/2}/\text{min}$
1	0.40	15	5.5	$y_{\text{LR}} = -0.0216x + 2.132$	0.0216	32.4
2	0.40	15	5.5	$y_{\text{RR}} = -0.0190x + 2.441$	0.0190	36.5
3	0.63	15	5.5	$y_{\text{LR}} = -0.0340x + 2.104$	0.0340	20.4
4	0.63	15	5.5	$y_{\text{RR}} = -0.0290x + 2.464$	0.0290	23.9
5	1.28	15	5.5	$y_{\text{LR}} = -0.0602x + 2.096$	0.0602	11.5
6	1.28	15	5.5	$y_{\text{RR}} = -0.0550x + 2.400$	0.0550	12.6
7	2.80	15	5.5	$y_{\text{LR}} = -0.0673x + 2.075$	0.0673	10.3
8	2.80	15	5.5	$y_{\text{RR}} = -0.0650x + 2.340$	0.0650	10.7
9	15.12	15	5.5	$y_{\text{LR}} = -0.183x + 1.684$	0.183	3.8
10	15.12	15	5.5	$y_{\text{RR}} = -0.111x + 2.271$	0.111	6.2
11	2.80	15	1.0	$y_{\text{LR}} = -0.0855x + 2.027$	0.0855	8.1
12	2.80	15	1.0	$y_{\text{RR}} = -0.0790x + 2.391$	0.0790	8.8
13	2.80	15	3.0	$y_{\text{LR}} = -0.0909x + 2.012$	0.0909	7.6
14	2.80	15	3.0	$y_{\text{RR}} = -0.0728x + 2.421$	0.0728	9.5
15	2.80	15	7.0	$y_{\text{LR}} = -0.0780x + 2.068$	0.0780	8.9
16	2.80	15	7.0	$y_{\text{RR}} = -0.0655x + 2.354$	0.0655	10.5
17	2.80	15	9.0	$y_{\text{LR}} = -0.0660x + 1.915$	0.0660	10.6
18	2.80	15	9.0	$y_{\text{RR}} = -0.0690x + 2.342$	0.0690	10.0
19	2.80	15	11.0	$y_{\text{LR}} = -0.0728x + 2.019$	0.0728	9.5
20	2.80	15	11.0	$y_{\text{RR}} = -0.0730x + 2.408$	0.0730	9.5
21	2.80	10	5.5	$y_{\text{LR}} = -0.0690x + 2.311$	0.0690	10.0
22	2.80	10	5.5	$y_{\text{RR}} = -0.0860x + 1.920$	0.0860	8.1
23	2.80	20	5.5	$y_{\text{LR}} = -0.0771x + 2.387$	0.0771	9.0
24	2.80	20	5.5	$y_{\text{RR}} = -0.0985x + 1.942$	0.0985	7.0
25	2.80	25	5.5	$y_{\text{LR}} = -0.0835x + 2.442$	0.0835	8.3
26	2.80	25	5.5	$y_{\text{RR}} = 0.109x + 1.911$	0.109	6.4
27	2.80	35	5.5	$y_{\text{LR}} = -0.103x + 2.435$	0.103	6.7
28	2.80	35	5.5	$y_{\text{RR}} = -0.117x + 1.841$	0.117	5.9

^a表中 y_{LR} 表示 MC-LR 的光降解拟合结果, y_{RR} 表示 MC-RR 的光降解拟合结果;以上所有动力学方程的样本数为 10,经统计学检验在 $\alpha < 0.01$ 的水平下显著性较好.

2.2.2 环境因子的影响

由表2可以看出:光照强度是影响 MC-RR 和 MC-LR 降解极其重要的因素,当改变紫外光的辐射强度时,这两种毒素降解的半衰期都有大幅度的变化.这也可以用上述光降解理论加以解释.增加紫外光照射的强度,也就是增加了光的能量,可能更有利于产生单线态的氧,从而加快了毒素的分解.

温度也是影响光降解速率和半衰期的重要因素之一.表2的结果表明:随着温度的升高,两种毒素的降解速率增大,半衰期减小.

酸度对 MC-LR 和 MC-RR 光降解速率的影响较小,并且毒素在酸性条件下降解略有加快,这可能与在酸性的条件下氧化电位升高,增强了氧化性有关.

2.3 微囊藻毒素的光解异构化

用弱强度紫外光照射 MC-LR 和 MC-RR 的各实验组中,光照几分钟后在 HPLC 图谱上会出现一些中间产物的峰,并且这些中间产物的浓度随时间呈现有规律的变化.

图3显示的是在紫外光波长为 254 nm,光照强度为 0.63 mW/cm² 的条件下,不同降解时间的 HPLC 色谱图.从图中可以看出产物 A, B, X 和 Y 的保留时间与 MC-LR 相差很近,它们具有相似的色谱保留行为,以 LR 作为标准近似定量 A, B, X 和 Y; A, B, X 和 Y 的浓度随时间的变化如图4所示.用制备型 HPLC 将 X 和 Y 两个中间产物分离,并分别用 HPLC 和 ELISA 进行检测,测定结果如表3所示.

表3 X, Y 浓度的 ELISA 和 HPLC 检测结果

Table 3 Concentrations of X and Y detected by HPLC and ELISA methods

	HPLC 结果/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	ELISA 结果/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
产物 X	0.89	1.26
产物 Y	0.94	2.22
产物 A	0.36	0.60
产物 B	1.40	1.05

由 ELISA 检测结果可以做出初步判断: X, Y, A 和 B 都具有与 MC 相似结构(见图1),可能是 MC 的异构体.从图4可以看出 X, Y, A 和 B 在降解 3 min 左右时异构体浓度达到最大,然后随着光照时间的增加异构体也逐渐被降解.用强度较弱的 UV-C 照射低浓度的 MC-LR 时发现:开始 3 min 浓度变化相对较慢(图5),与强光照射和高浓度的各组有明显差异;这主要是由于毒素在弱光照射下会发生异构化,弱光照射 3 min 左右异构体的浓度最高,对于环境水体中超痕量毒素的检测,只能采用 ELISA 方法,而 ELISA 检测的毒素浓度为总浓度(包括异构体的浓度),因此降解开始的几分钟总体浓度变化不大.微囊藻毒素在紫外光的照射下出现异构化现象可能与其特殊的分子结构有一定关系,从图1中可以看出它由一个苯环、一个肽环和一个共轭双键组成.当受到紫外光的高能辐射时,共轭双键可能会发生旋转,使得苯环和肽环两个平面之间的角度发生改变,从而形成异构体.

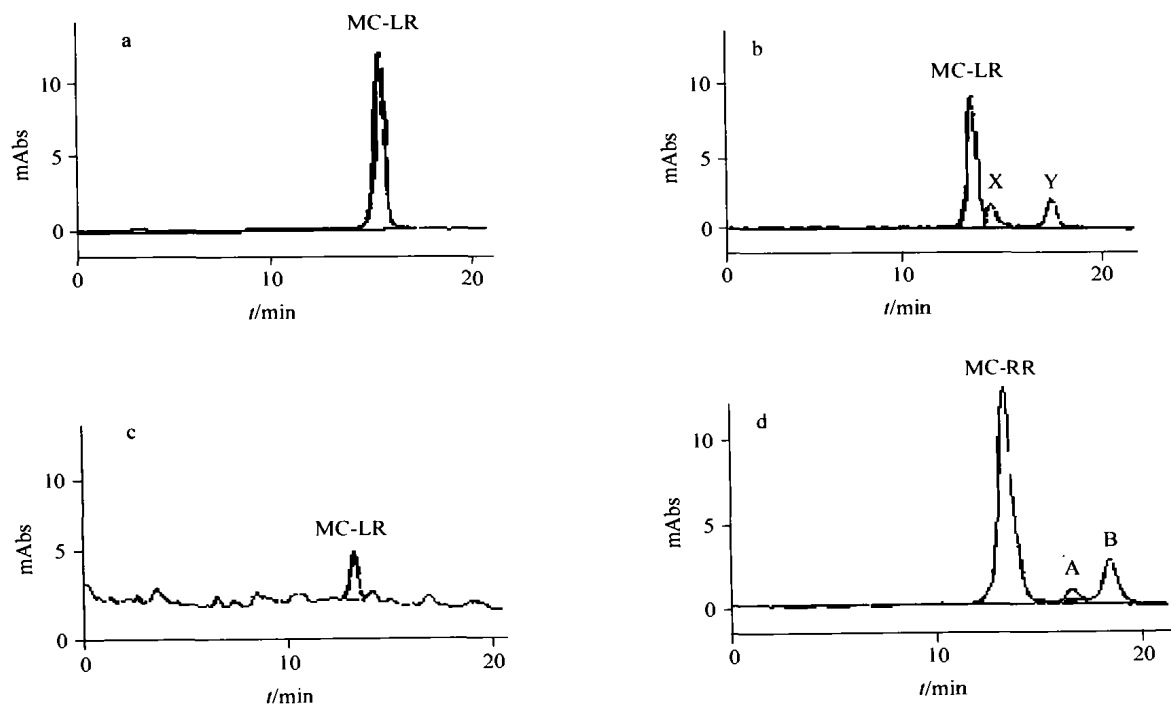


图3 MC-LR 和 MC-RR 在弱紫外光照射下不同时刻的 HPLC 图谱

a: 降解前 MC-LR 的 HPLC 图谱; b: 降解 2 min 时 MC-LR 的 HPLC 图谱; c: 降解 39 min 时 MC-LR 的 HPLC 图谱; d: 降解 3 min MC-RR 的 HPLC 图谱

Figure 3 Chromatograms of MC-LR and MC-RR at different time after lighting with weaker UV-irradiation

(a) Before irradiation by UV-c light; (b) Two minutes after UV-c irradiation; (c) 39 minutes after UV-c irradiation; (d) Three minutes after UV-c irradiation

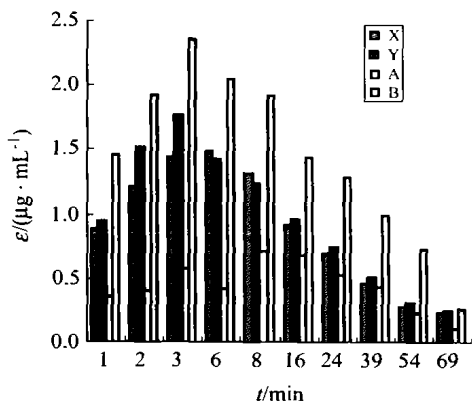


图4 X, Y, A 和 B 浓度变化与时间关系图

Figure 4 Concentrations of X, Y, A and B with different illumination time

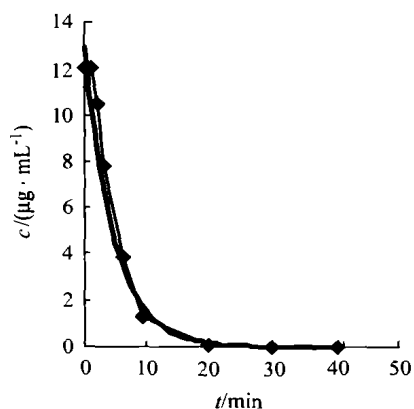


图5 低浓度 MC-LR 在弱紫外光照射下的光降解

Figure 5 Photodecomposition of low concentration MC-LR by weaker UV-irradiation

2.4 环境水体中毒素的光降解模拟研究

为了考察实际水体中毒素在紫外光下的降解情况,我们按照同样的条件,模拟环境水体中低浓度的藻毒素分别进行各组实验,结果发现低浓度各组毒素降解情况和高浓度组的很相似:在合适条件下,40 min 即可去除水体中 95% 以上的毒素。

水体腐殖质通常被认为是一种光敏剂^[14],在复合紫外光或日光照射下,对降解具有促进作用.曾有报道^[15]认为:腐殖质对日光或复合紫外光中的 290 nm 到可见光这一波段具有很强的吸收特性,原因是形成高活性的 O₃ 和 H₂O₂ 等物质,促进光降解.本工作以单波长的紫外光 UV-C 进行照射,分别用 0.05 g/L 的腐殖酸、含腐殖质的湖水以及超纯水配置成相同浓度的毒素溶液进行对照实验,所得结果恰恰相反,降解最快的为超纯水配制成的毒素溶液,其次是含有少量腐殖质的湖水,最慢的是含有 0.05 g/L 的腐殖酸溶液(如图 6).其原因可能是对波长大于 290 nm 的波段,腐殖酸可以起到增强吸收的作用,而对于 254 nm 的单色光源,腐殖酸的存在对促进紫外吸收所起到的作用甚微,相反会猝灭溶液中所形成的单线态的氧,从而在一定程度上抑制了毒素的光降

解。

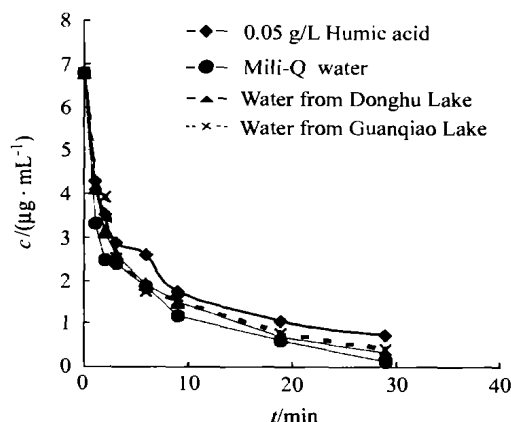


图6 MC-LR 在不同介质中的光降解

Figure 6 Photodecomposition of MC-LR by UV-irradiation in different media

本研究获得了紫外光照射后产生的异构体,通过有机波谱鉴定其化学结构,一方面可以研究异构体的毒理学行为,探索光照射后产生的异构体是否可以由天然蓝藻产生;另一方面可以从物理化学和结构化学领域对光照射后异构体的生成及其稳定性方面开展研究.本工作为进一步开展微囊藻毒素在水环境中的迁移变化规律的研究,及其在生态毒理学和饮用水源的水质改善等领域的研究作了有益的探索。

3 结论

(1) 微囊藻毒素的光降解反应符合准一级动力学模型,光照强度是影响光降解速率的最主要的因素;温度、酸度对降解半衰期也有一定影响。

(2) 不同波长紫外光对毒素降解能力相差很大,波长短、能量大的 UV-C 对微囊藻毒素的降解作用非常明显。

(3) 弱光照射下,微囊藻毒素在光解反应的开始阶段会发生一定程度的异构化,随着光照时间的增加,异构体浓度会逐渐减少。

(4) 条件合适,自然水体中的微囊藻毒素在紫外光 UV-C 的照射下,40 min 内即可去除 95% 以上;水体腐殖质在 UV-C 的照射下对光降解具有一定的抑制作用。

References

- 1 Benjamin, J. P. A.; Linda, A. L.; Peter, K. *Appl. Catal., B* **2000**, *25*, 59.
- 2 Oudra, B.; Loudiki, M.; Sbiyyaa, B.; Martins, R.; Vasconcelos, V.; Namikoshi, N. *Toxicon* **2001**, *39*, 1375.
- 3 Hesse, K.; Dittmann, E.; Börner, T. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2001**, *37*, 39.
- 4 Iain, L.; Linda, A. L.; Ben, C.; Peter, K. *J. Photochem.*

- Photobiol.*, A **2002**, 148, 349.
- 5 Shephard, G. S.; Stockenström, S.; Villiers, D.; Engelberecht, W. J.; Wessels, G. *Water Res.* **2002**, 36, 140.
- 6 Carmichael, W. W. *A Status Report on Planktonic Cyanobacteria (Blue-green Algae) and Their Toxins*, United States Environmental Protection Agency, 1600/R-92/79, **1992**, pp. 15 ~ 26.
- 7 Bellar, T. A. *J. Am. Water Works Assoc.* **1974**, 68, 703.
- 8 Zhang, W.-H.; Fang, T.; Xu, X.-Q. *China Environ. Sci.* **2001**, 21(1), 1 (in Chinese)
(张维昊, 方涛, 徐小清, 中国环境科学, **2001**, 21(1), 1.)
- 9 Ramanan, S.; Tang, J.; Velayudhan, A. *J. Chromatogr. A* **2000**, 883, 103.
- 10 Pelander, A.; Ojanperä, I.; Lahti, K.; Niinivaara, K.; Vuori, E. *Water Res.* **2000**, 34, 2643.
- 11 Tsutsumi, T.; Nagata, S.; Yoshida, F. *Food Agric. Immunol.* **2000**, 12, 231.
- 12 Murthy, N. B. K.; Moza, P. N.; Hustert, K.; Raghu, K.; Kettrup, A. *Chemosphere* **1996**, 33, 1915.
- 13 Li, S.-J.; Ji, C.-G. *Principle and Application of Macromolecule Chemistry*, Fudan University Press, Shanghai, **1993**, p. 464 (in Chinese).
(李善君, 纪才圭, 高分子化学原理及应用, 复旦大学出版社, 上海, **1993**, p. 464.)
- 14 Welker, M.; Steinberg C. *Water Res.* **1999**, 33, 1159.
- 15 Cooper, W. J.; Zika, R. G. *Adv. Chem. Ser.* **1989**, 219, 333.

(A0303135 LU, Y. J.; FAN, Y. Y.)