

水环境中微囊藻毒素检测技术研究进展

盛建武 何 苗 施汉昌 钱 易

(清华大学环境科学与工程系 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室,北京 100084)

摘要 随着世界各国对微囊藻毒素的重视,中国也在相关水质标准里新增了微囊藻毒素这项指标。因此,水环境中微囊藻毒素的检测和控制变得非常重要,而检测更是控制的基础。比较详细地综述了目前国内外在微囊藻毒素检测方面的各种不同的研究方法和成果;并在总结这些研究的基础上,展望了微囊藻毒素检测的发展方向。

关键词 水环境 微囊藻毒素 检测技术

Review on detection technologies of microcystins in aquatic environment Sheng Jianwu, He Miao, Shi Hanchang, Qian Yi. (ESPC State Key Joint Laboratory, Dept. of Environment Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084)

Abstract: With the increasing recognition of Microcystins (MCs), China had added Microcystin-LR into the related water quality standards. It is very important to detect and control the MCs in aquatic environment, and detection is the base of control. This review introduced several kinds of analyzing and detecting methods about MCs, and the development trend of MCs' detection was proposed.

Keywords: Aquatic environment Microcystins Detection technology

水体富营养化致使水质恶化,更严重的是异常增殖藻类释放生物毒素——藻毒素,这些次级代谢产物严重危害了人类的健康和生态安全。淡水藻类中的蓝绿藻属分泌的蓝藻毒素是污染范围最广的一类藻毒素,蓝藻毒素中又以微囊藻等产生的微囊藻毒素(MCs)更应该引起重视,其中的微囊藻毒素-LR是目前已知的毒性最强、急性危害最大的一种淡水蓝藻毒素。基于此,世界各国和国际组织都制定了严格的标准限制藻毒素。如WHO推荐的饮水中的藻毒素标准为 $1.0\mu\text{g/L}$ ^[1],加拿大健康组织规定饮水中可接受的藻毒素标准为 $0.5\mu\text{g/L}$,澳大利亚学者建议 $1\mu\text{g/L}$ 为安全饮用水的上限,我国现颁布执行的生活饮用水水质卫生规范(2001,0.001 mg/L)和地表水环境质量标准(GB 3838—2002,微囊藻毒素-LR为0.001 mg/L)都包含了MCs的检测项目。

综合目前MCs分析和检测研究的进展情况,藻毒素的检测分析方法主要有生物分析法、物理化学分析法和生物化学分析法。另外,从预警的角度出发,也有人开展了对藻类的监测研究。

1 生物分析法

传统的生物分析法通常用小鼠腹腔注射或口腔灌喂评价MCs的毒性。

用纯化的MCs或水华蓝藻中粗提藻毒素进行测试,根据其生理病变及半致死量可初步确定其毒

性(除个别异构体的 LD_{50} 为 $200\sim 250\mu\text{g/kg}$,多数MCs的 LD_{50} 为 $60\sim 70\mu\text{g/kg}$)。这也是毒理评价的常用方法。此外还有用无脊椎动物如虾、贝、水蚤及其卵进行毒性评价的研究,以细菌进行毒性试验和生物分析也有报道^[2,3]。这类方法灵敏度较差,所得到的毒型结果与小鼠的品系有关,可比性较差,且无法确定毒素类型及结构。但该方法操作简单,且可以监测到过去未曾发现的新毒素^[4]。

Gehring等^[5]研究了一种植物试验检测水体中藻毒素的方法,采用家独行菜作为检测植物,秧苗持续暴露在 $1\mu\text{g/L}$ 的MC-LR中时,根部从2~6 d有明显退化现象,叶也有明显的变化。

2 物理化学分析法

2.1 高效液相色谱及相关检测技术

液相色谱可以分析一些气相色谱无法分析的挥发性差、极性高、热稳定性差的物质。常用的检测器有紫外-可见光(UV-VIS)检测器、示差折光检测器、荧光、化学发光检测器、火焰离子化检测器和电化学检测器等^[6~11]。

目前,对MCs的化学检测常采用HPLC/UV法。一般步骤是先采用正相或反相色谱柱对毒素进行固相萃取分离,然后将纯化后的毒素进行紫外检测。将被测毒素与标准毒素的滞留时间(即峰出现的时间)进行比较,可对被测的不同藻毒素种类进行

第一作者:盛建武,男,1978年生,博士研究生,研究方向为水污染控制。

鉴定;将被测毒素与标准毒素的峰面积进行比较,可对某种藻毒素进行精确定量。监测限度一般为 ng 级^[12]。对于常见的有标准毒素出售的几种毒素,用 HPLC 方法监测毒素含量是目前常规监测的主要方法之一。但由于 HPLC 检测技术需要标准毒素用来获得标准曲线和吸收峰值,而目前已发现 60 多种 MCs,多数缺乏标准毒素,这很大程度上限制了 MCs 的定性、定量监测;而且 HPLC 设备比较庞大,前处理较为复杂,尤其是从水样中提取和纯化藻毒素。目前关于 HPLC 的改进检测技术大多基于以下方面。

(1) Tsutsumi 等^[13]开发了一种免疫吸附柱(IAC)可用于自来水中痕量 MCs (pg/L ~ ng/L) 的浓缩,再利用 HPLC 或酶联免疫吸附检测(ELISA)检测分析,回收率在 80 % 以上。

(2) Kondo 等^[14]为了解决 HPLC 对于样品预处理过程复杂且要求高度纯化的难题,开发了一种可用于纯化 MCs 的免疫亲和吸附柱。这种吸附柱表面包被了一层 MC-LR 的单克隆抗体,当水样通过柱子时,MCs 被吸附固定下来,对柱子进行洗脱,将洗脱液干燥后溶解于甲醇水溶液中,用于 LC/MS 检测和分析。这种吸附柱具有可再生性,但是建议只再生 3 次(3 次再生后,恢复率仅为 63 % ~ 77 %)。

这样的纯化能使具有 Adda 结构的藻毒素共存于洗脱液中,而其他的物质早已被滤液带走。利用 HPLC-PDA (光二极管阵列, Photo Diode Array) 分析洗脱液,能得到各种藻毒素的明显吸收峰,干扰较少,因而可比较精确地测定各种藻毒素的含量,累计即得总量。

许多因素影响 HPLC 对样品中 MCs 的回收率,聚丙烯塑料容器和移液枪头将吸附部分 MC-LR;使用溶剂对 MC-LR 进行稀释时,采取纯水或不同浓度的甲醇、乙腈,差别将会很大^[15]。另外,固相萃取柱的使用也是影响 MC-LR 回收率的一个重要因素。有人用阳离子表面活性剂对自然水体中的蓝藻毒素进行多点萃取和预富集,对 MC-LR 和 M-RR 的回收率分别为(113.9 ± 9) % 和(87.1 ± 7) %^[16]。

2.2 液相色谱-质谱联用

由于缺乏标准毒素,这限制了 HPLC 的进一步应用。但 LC/MS 技术很好地解决了这一问题,即使没有标准毒素,只要知道这种毒素的分子量,LC/MS 技术即可对毒素进行精确定量检测^[17,18]。

液相色谱/电喷雾电离质谱(HPLC/ESI-MS)可以测定水中的 MCs,一般采用乙腈-水-甲酸作为流动相,通过准确的分子量及结构信息,确定毒素类型^[19]。

虞锐鹏等^[20]先通过固相萃取富集 MCs,并采用 HPLC/ESI-MS 测定微囊藻毒素 RR、LR,分别在 *mz* 为 520.4、996.3 时,采用选择离子扫描方式,提高检测灵敏度。该法检出限为 0.01 μg/L;线性定量范围为 0.02 ~ 20.00 μg/L。该方法实用性强,可为水质检测领域藻毒素风险评价和监测水处理脱毒效能提供痕量、快速、灵敏、准确的分析方法。

2.3 MMPB 法

多数化学监测技术能够监测某一种 MC 的含量,但不能对总毒素进行定量。也有人研究用化学方法对 MCs 进行总量测定^[21]。Sano 等^[22]建立了一种监测 MCs 总量的化学监测技术,他们将 MCs 中的一个氨基酸残基 Adda 上的碳碳双键氧化断裂后得到 2-甲基-3-甲氧基-4-苯丁酸(MMPB),可通过气相色谱以火焰离子化检测器(GC-FID)分析或液相色谱与荧光检测器(HPLC-FD)分析。该法需要萃取、清洗、氧化、后处理等烦琐的程序以消除衍生化过程中的溶剂干扰,利用臭氧氧化 MCs 形成 MMPB 将大大缩短合成时间,也避免了烦琐的过程。该法可快速、准确地分析样品的 MCs 总浓度,还可运用到复杂固体基质中的毒性分析,监测限度为 pg 级^[23,24]。由于 Adda 是所有 MCs 均具有的结构,因此用这种方法得到的是 MCs 的总量,但整个过程要花费很长时间。为克服这一缺点,Harada 等建立了一种利用臭氧分解产生 MMPB 的方法,他们将悬浮在甲醇溶液中的藻细胞直接在低温下(-78 °C)进行臭氧分解,然后用热激发液相色谱/质谱(TSP-LC/MS)或电离离子化气相色谱/质谱(ESI-GC/MS)进行监测,整个过程可在 30 min 内完成,监测限度为 ng 级^[25]。

2.4 薄层色谱法

薄层色谱法(TLC)由于其设备要求低,操作简单、方便、快速,有较好的灵敏度,在 MCs 分离、分析中有较好的应用前景。但由于水样中存在较多干扰物,对其实际应用还有待研究^[26]。

Pelander 等^[27]进行了 TLC 用于检测 MCs 的研究,N,N-二甲基-1,4-苯二胺二氯化物(N,N-DPDD)的采用使该方法更加优化,能达到 WHO 给定的 1 μg/L 的检测限。

3 生物化学分析法

3.1 免疫检测技术

自 20 世纪 80 年代开始,ELISA 开始用于 MCs 的监测。水质免疫检测中最常用的检测方法是竞争性非匀相酶联免疫检测。常用的商品化 ELISA 试

剂盒是利用 MC-LR—HRP 的直接竞争性 ELISA 方法。其程序一般是先将 MCs 抗体包被(固定)在酶标板上,使用时加入水样和定量的 MC-LR—HRP 偶联物,最后加入显色底物后,显色测定。

Chu 等^[28]首先提出了应用 ELISA 监测 MCs 的完整程序,他们将 MC-LR 与牛血清蛋白偶联,用得到的偶联物免疫制备兔抗 MC-LR 多克隆抗体,然后将 MC-LR 与辣根过氧化物酶偶联,以邻苯二胺(OPD)为底物用直接竞争法做 ELISA。用不同浓度的标准毒素 MC-LR 作标准曲线,根据底物的显色程度与标准曲线作比较即可求出毒素的含量,监测限度为 0.20 $\mu\text{g/L}$ 。他们发现抗 MC-LR PAb 与 MC-LR、-RR、-YR 有较好的交叉反应性,但与 MC-LY、-LA 的交叉反应性低。

ELISA 技术和 ELISA 试剂盒的关键是所应用的 MCs 的抗体。关于 MCs 多克隆抗体和单克隆抗体的制备研究,国外已经有多篇文献报道^[29~34],主要研究方向是完全抗原的制备、抗体的制备(尤其是单抗)、抗体的性能测试、抗体的应用等,主要评价指标是检验所获得的抗体在应用过程中是否具有好的特异性、稳定性,是否能达到应用的目的和需求。

3.2 细胞毒性检测技术

细胞毒性检测技术是利用毒素对细胞的毒性作用来监测毒素的一种技术,不仅可以判断毒素存在与否,而且可以对毒素进行精确的定量。这种方法监测的也是能发挥相同毒性作用的毒素的总量。

Fladmark 等^[35]建立了一种根据 MCs 导致鲑鱼或大鼠肝细胞凋亡的程度来确定 MCs 的方法。他们将分离的鲑鱼或大鼠的肝细胞悬浮培养,然后加入 MCs,根据细胞凋亡的程度即可求出 MCs 的含量,监测限度为 10~20 ng。动物细胞凋亡的第一个信号是发生凋亡的细胞与邻近的细胞分离。根据这一特性,Fladmark 等还建立了用 MCs 导致悬浮培养的鲑鱼或大鼠肝细胞解聚的程度来监测毒素的方法,所得结果比用判断细胞凋亡的程度所得结果灵敏 5~10 倍。

3.3 蛋白磷酸酶抑制试验

MCs 是通过作用于蛋白磷酸酶 1 和 2A 的 Ser 和 Thr 而发挥其毒性作用的,毒素与其 Ser 和 Thr 之间有很高的亲和力,根据这一特性,人们可以通过对酶活性的抑制程度来监测这几种毒素。自 Holmes 等提出蛋白磷酸酶抑制检测技术(PPIA)以来,这种技术得到了迅速发展^[36~38]。但由于竞争性抑制检测技术针对的是毒素的功能而不是结构,因此所得结果是具有相同功能的毒素的总量,而不是某一种毒素的量,所

测物质被称为 MCs 类物质,并以 MC-LR 当量作为测定结果。但是蓝藻本身具有的内源蛋白磷酸酶活性有可能使监测结果偏低。

PPIA 多数以³²P 标记的糖原磷酸化酶 a 为底物。由于糖原磷酸化酶 a 只能被 PP1 和 PP2A 水解,而 PP1 和 PP2A 又可被 MCs 等抑制,因此在 MCs、PP 和糖原磷酸化酶反应后根据 PP 水解糖原磷酸化酶 a 释放出³²P 的量就可计算出毒素的量。一般用不同浓度的标准毒素 MC-LR 作标准曲线,用 MC-LR 的量来代表总毒素的量。随着对硝基苯酚磷酸酯(pNPP)可被 PP 水解现象的发现,人们建立了一种以 pNPP 为底物的磷酸酶抑制比色监测技术,根据 pNPP 被水解后产生的有色产物的多少来确定毒素的量。PPIA 的监测限度为 μg 级,它监测的是能抑制 PP 的总毒素的量,而不是某一种毒素的量。但蓝藻本身具有的内源蛋白磷酸酶活性有可能使 PPIA 的结果偏低^[39]。

徐立红等^[40]也用鱼肝 PP2A 和不同时间制备的³²P 标记底物,建立了毒素对蛋白磷酸酶抑制的标准曲线,重现性非常好,定量检测的下限为 0.02 $\mu\text{g/L}$ 。

Serres 等^[41]让未标记的被测毒素和¹²⁵I 标记的 MC-YR 一起与 PP2A 进行竞争结合,达平衡后进行凝胶过滤,使与 PP2A 结合的毒素和未与 PP2A 结合的毒素分离,然后测收集到的¹²⁵I-MC-YR-PP2A 放射性。根据用 B/(B₀-B) (B₀为无毒素时¹²⁵I-MC-YR 的放射性,B 为有标准毒素或待测毒素时¹²⁵I-MC-YR 的放射性)和标准毒素的浓度得到的标准曲线即可求出待测毒素的量。这种技术受样品中其他物质的干扰较小,灵敏度更高,对 MCs 和 Nodularin 的检测限度低于 2.5 $\mu\text{g/L}$ 。

4 藻类监测技术

藻类的监测工作也开展得很多^[42]。监测淡水水体中藻类的生长情况能够预测水体中藻毒素的增长情况,其中可能还有某种相关关系^[43]。

有人利用特异引物(TOX 1P/1F, TOX 2P/2F)检测特殊的多肽合成酶基因——mcyB 片段在 38 种水华蓝藻中的分布情况,结果显示,所有能产生 MCs 的微囊藻都有特异扩增条带,非产毒株则没有。本研究发展了以全细胞 PCR 检测法适用于不同来源的蓝藻材料。全细胞 PCR 法不仅可用于实验室产毒微囊藻的鉴定和筛选,如果结合产毒细胞数与水体毒性大小的相关性,及时监测自然水体里的产 MCs 的微囊藻藻株,还可建立以产毒细胞数为标准的不同层次的警报系统,及早地对毒素的危害

表 1 几种微囊藻毒素检测技术的比较

检测技术	优势	劣势
小鼠法	毒素的有害效应易检测到 操作简单	不能区分微囊藻毒素的异构体 工作量较大
HPLC	对不同毒素可进行定性和定量	样品需预处理;缺乏标准品 设备庞大、昂贵;需专业人员
ELISA	可检测到毒素的不同同系物 商品试剂盒的出现大大方便了操作 高灵敏度	对多种同系物的识别需要广谱抗体; 商品化的试剂盒可靠性需进一步检验; 标准不统一
PPIA	只监测 PP1 和 PP2A 的抑制剂 高灵敏度	测定毒素总量,不能区分特异的毒素同系物 需要新制备的放射性底物;放射性废物的处理困难
细胞毒性监测	用原代肝细胞可获得高灵敏度 用建立的细胞系可方便实验	原代肝细胞的生产工作量大 建立的细胞系往往灵敏度较低

加以控制和去除^[44,45]。

Miguel 等^[46]开发了一种基于组织学的生物传感器检测系统,其原理是利用水体植物中发生光合作用的组织作为敏感源,通过检测这种光合作用的强度来确定水体中某种化学拮抗剂的含量。传感器的感应部位是一个目前已广泛应用的用来测定活体光合作用组织的荧光感应器。他们用这套检测系统来监测田纳西州所有饮用水水源水中藻类的生长情况。这种传感器的显著特点是能够非常简单方便地实时在线检测水源的水质。这套传感器检测系统完全可以用来对阳光直射的饮用水水源进行长期的快速预警检测,一旦发现藻类生长迅速,浓度高,即意味着水体里由藻类分泌产生的藻毒素含量即将要升高,于是水厂能够及时采取措施来处理这一变化,避免事故的发生。

5 分析和展望

关于藻毒素的检测和分析方法的研究已经成为一个研究热点,许多的研究机构已经参与进来,提出了各种不同的思路和方法,也有人热衷于将目前常用的几种方法相互对比,挖掘出各自的优劣所在,这里不再详细描述,对于几种常见的检测方法的比较,列于表 1。

需要指出的是,高效液相色谱仪及液相色谱/质谱联用是定量检测和分析 MCs 最经典最可靠的技术,检测限 ng 以下,准确度和选择性都表现最为突出;同时,蛋白磷酸酶抑制试验和酶联免疫吸附试验越来越体现出其特有的优势,其研究也开展得越来越广泛,但总体来说,PPIA、ELISA 等检测技术仍然处于研究开发阶段,大规模的应用尚需在检测精度的提高、稳定性的保持、操作的简便和经济性等方面加强和提高。

总之,水环境中 MCs 的分析和检测方法的发展趋势是更加经济、方便、快速、准确,并有望实现水中

MCs 的连续和在线监测分析。

参考文献

1 World Health Organization. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. London, UK, E & FN Spon, 1999

2 Meriluoto J, Härmälä Braskén A S, Eriksson J, et al. Choosing analytical strategy for microcystins. Phycologia, 1996, 35(Suppl. 6): 125 ~ 132

3 Sturgeon S, Townner R, Palander A. In vivo assessment of microcystin-LR induced hepatotoxicity in the rat using proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) imaging. Viochimica & biophysica Acta, 1999, 144(2): 227 ~ 232

4 Bouaïcha Nouredine, Rivasseau Corinne, Hennion Marie-Claire, et al. Detection of cyanobacterial toxins (microcystins) in cell extracts by micellar electrokinetic chromatography. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1996, 685(1): 53 ~ 57

5 Gehringer Michelle M, Kewada Vijayne, Coates Nadya, et al. The use of Lepidium sativum in a plant bioassay system for the detection of microcystin-LR. Toxicon, 2003, 41(7): 871 ~ 876

6 Lam Angeline K Y, Fedorak Phillip M, Prepas Ellie E. Biotransformation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR, as determined by HPLC and protein phosphatase bioassay. Environ. Sci. Technol., 1995, 29(1): 242 ~ 246

7 Lee Hye Suk, Jeong Chang Kyun, Lee Hyun Mi, et al. On-line trace enrichment for the simultaneous determination of microcystins in aqueous samples using high-performance liquid chromatography with diode-array detection. Journal of Chromatography A, 1999, 848(1 ~ 2): 179 ~ 184

8 Aguete E C, Gago Martínez A, Leão J M, et al. HPLC and HPCE analysis of microcystins RR, LR and YR present in cyanobacteria and water by using immunoaffinity extraction. Talanta, 2003, 59(4): 697 ~ 705

9 Shen P P, Shi Q, Hua Z C, et al. Analysis of microcystins in cyanobacteria blooms and surface water samples from Meiliang Bay, Taihu Lake, China. Environment International, 2003, 29(5): 641 ~ 647

10 Ortea Paloma Muñoz, Allis Orla, Healy Brendan M, et al. Determination of toxic cyclic heptapeptides by liquid chromatography with detection using ultra-violet, protein phosphatase assay and tandem mass spectrometry. Chemosphere, 2004, 55(10): 1395 ~ 1402

11 Zeck A, Weller M G, Niessner R. Multidimensional biochemical detection of microcystins in liquid chromatography. Anal. Chem., 2001, 73(22): 5509 ~ 5517

12 Meriluoto Jussi. Chromatography of microcystins. Analytica Chimica Acta, 1997, 352(1 ~ 3): 277 ~ 298

13 Tsutsumi T, Nagata S, Hasegawa A, et al. Immunoaffinity column as clean-up tool for determination of trace amounts of microcystins in tap water. Food and Chemical Toxicology,

- 2000, 38(7) : 593 ~ 597
- 14 Kondo Fumio, Ito Yuko, Oka Hisao, et al. Determination of microcystins in lake water using reusable immunoaffinity column. *Toxicon*, 2002, 40(7) : 893 ~ 899
- 15 Hyenstrand P, Metcalf J S, Beattie K A, et al. Effects of adsorption to plastics and solvent conditions in the analysis of the cyanobacterial toxin microcystin-LR by high performance liquid chromatography. *Water Research*, 2001, 35(14) : 3508 ~ 3511
- 16 Kwok Wai Man B, Hon Wah Lam M, Lam P K S, et al. Cloud-point extraction and preconcentration of cyanobacterial toxins (microcystins) from natural waters using a cationic surfactant. *Environ. Sci. Technol.*, 2002, 36(18) : 3985 ~ 3990
- 17 Dell'Aversano Carmela, Eaglesham Geoffrey K, Quilliam Michael A. Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1028(1) : 155 ~ 164
- 18 Harada Ken ichi, Imanishi Susumu, Kato Hajime, et al. Isolation of Adda from microcystin-LR by microbial degradation. *Toxicon*, 2004, 44(1) : 107 ~ 109
- 19 王东利, 李洁, 梁亚莉, 等. 水中痕量微囊藻毒素的测定. *中国公共卫生*, 2003, 19(8) : 992 ~ 993
- 20 虞锐鹏, 陶冠军, 秦方, 等. 液相色谱-电喷雾电离质谱法测定水中的微囊藻毒素. *分析化学研究简报*, 2003, 31(12) : 1462 ~ 1464
- 21 Kaya Kunimitsu, Sano Tomoharu, Inoue Hiroko, et al. Selective determination of total normal microcystin by colorimetry, LC/UV detection and/or LC/MS. *Analytica Chimica Acta*, 2001, 450(1 ~ 2) : 73 ~ 80
- 22 Sano T, Nohara K, Shirai F, et al. A method for microdetection of total microcystin content in waterbloom of cyanobacteria (blue-green algae). *Int. J. Environ. Analyt. Chem.*, 1992, 49:163 ~ 170
- 23 Tsuji Kiyomi, Masui Hiroaki, Uemura Hitoshi, et al. Analysis of microcystins in sediments using MMPB method. *Toxicon*, 2001, 39(5) : 687 ~ 692
- 24 Kaya Kunimitsu, Sano Tomoharu. Total microcystin determination using erythro-2-methyl-3-(methoxy-d3)-4-phenylbutyric acid (MMPB-d3) as the internal standard. *Analytica Chimica Acta*, 1999, 386(1 ~ 2) : 107 ~ 112
- 25 Dahlmann J, Budakowski W R, Luckas B. Liquid chromatography electrospray ionisation-mass spectrometry based method for the simultaneous determination of algal and cyanobacterial toxins in phytoplankton from marine waters and lakes followed by tentative structural elucidation of microcystins. *Journal of Chromatography A*, 2003, 994(1 ~ 2) : 45 ~ 57
- 26 Pelander A, Ojanperä, Sivonen K, et al. Screening for cyanobacterial toxins in bloom and strain samples by thin layer chromatography. *Wat. Res.*, 1996, 30(6) : 1464 ~ 1470
- 27 Pelander Anna, Ojanperä Ilkka, Lahti Kirsti, et al. Visual detection of cyanobacterial hepatotoxins by thin-layer chromatography and application to water analysis. *Water Research*, 2000, 34(10) : 2643 ~ 2652
- 28 Chu F S, Huang X, Wei R O. Enzyme-linked immunosorbent assay for microcystins in blue-green algal blooms. *J. Assoc. Off. Analyt. Chem.*, 1990, 73(3) : 451 ~ 456
- 29 Metcalf J S, Bell S G, Codd G A. Production of novel polyclonal antibodies against the cyanobacterial toxin microcystin-Lr and their application for the detection and quantification of microcystins and nodularin. *Wat. Res.*, 2000, 34(10) : 2761 ~ 2769
- 30 Mikhailov Andrey, Härmälä Braskén Ann-Sofi, Meriluoto Jussi, et al. Production and specificity of mono and polyclonal antibodies against microcystins conjugated through N-methyldehydroalanine. *Toxicon*, 2001, 39(4) : 477 ~ 483
- 31 Mikhailov Andrey, Härmälä Braskén Ann-Sofi, Polosukhina Elena, et al. Production and specificity of monoclonal antibodies against nodularin conjugated through N-methyldehydrobutyryne. *Toxicon*, 2001, 39(10) : 1453 ~ 1459
- 32 Fischer W J, Garthwaite I, Miles C O, et al. Congener-Independent Immunoassay for Microcystins and Nodularins. *Environ. Sci. Technol.*, 2001, 35(24) : 4849 ~ 4856
- 33 Yu F Y, Liu B H, Chou H N, et al. Development of a Sensitive ELISA for the Determination of Microcystins in Algae. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50(15) : 4176 ~ 4182
- 34 Pyo Dongjin, Choi Euiyule, Cha Geun Sig, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies against microcystin LR. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2003, 24(1) : 126 ~ 128
- 35 Fladmark K E, Serres M H, Larsen N L, et al. Sensitive detection of apoptotic toxins in suspension cultures of rat and salmon hepatocytes. *Toxicon*, 1998, 36, 1101 ~ 1114
- 36 Xu L H, Lam P K S, Chen J P, et al. Use of protein phosphatase inhibition assay to detect microcystins in Donghu Lake and a fish pond in China. *Chemosphere*, 2000, 41(1 ~ 2) : 53 ~ 58
- 37 Metcalf James S, Bell Steven G, Codd Geoffrey A. Colorimetric immuno-protein phosphatase inhibition assay for specific detection of microcystins and nodularins of cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(2) : 904 ~ 909
- 38 Robillot C dric, Hennion Marie-Claire. Issues arising when interpreting the results of the protein phosphatase 2A inhibition assay for the monitoring of microcystins. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 512(2) : 339 ~ 346
- 39 Yang Mengsu, Lam Paul K S. Effects of microcystins on phosphorylase- α binding to phosphatase-2A: kinetic analysis by surface plasmon resonance biosensor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/ General Subjects*, 1999, 1427(1) : 62 ~ 73
- 40 徐立红, 陈加平, 许建明, 等. 用蛋白磷酸酶抑制法测定水体中的微囊藻毒素类物质. *环境科学学报*, 1999, 19(5) : 536 ~ 539
- 41 Serres M H, Fladmark K E, Doskeland S O. An ultrasensitive competitive binding assay for the detection of toxins affecting protein phosphatases. *Toxicon*, 2000, 38(3) : 347 ~ 360
- 42 潘卉, 宋立荣, 刘永定, 等. 水华蓝藻产毒特性的 PCR 检测法. *水生生物学报*, 2001, 25(2) : 159 ~ 166
- 43 Oh Hee Mock, Lee Seog June, Kim Jee Hwan, et al. Seasonal variation and indirect monitoring of microcystin concentrations in daechung reservoir, Korea. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(4) : 1484 ~ 1489
- 44 Bittencourt-Oliveira Maria do Carmo. Detection of potential microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a mcyB molecular marker. *Harmful Algae*, 2003, 2(1) : 51 ~ 60
- 45 Baker Judith A, Entsch Barrie, Neilan Brett A, et al. Monitoring changing toxigenicity of a cyanobacterial bloom by molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(12) : 6070 ~ 6076
- 46 Miguel Jr Rodriguez, Sanders Charlene A, Greenbaum Elias. Biosensors for rapid monitoring of primary-source drinking water using naturally occurring photosynthesis. *Biosensors and Bioelectronics*, 2002, 17(10) : 843 ~ 849

责任编辑: 闵 怀 (修改稿收到日期: 2005-10-30)

高山湿地保护是全球湿地保护的重点

世界上一些大江大河起源于高山湿地。高山湿地常被视作“世界水塔”, 这类湿地是全球湿地保护的重点之一。在“湿地公约”秘书处组织帮助下, 近 10 年来, 已对安第斯山脉建立起有效的信息交流网络和协调机构, 并监测哥伦比亚高山湿地系统, 开展对泥炭地和农村环境影响评估活动, 对该地区湿地环境实施管理, 受益人口超过 1 亿; 关都库什——喜马拉雅山脉的高山湿地是恒河、湄公河、长江和黄河的发源地, 流域人口超过 10 亿, 湿地公约秘书处目前正在与当地和世界自然基金会合作, 对该地区采取保护措施。