

二氧化氯对球形棕囊藻叶绿素 a、 蛋白质、DNA 含量的影响

刘洁生*, 杨维东, 张 珩, 吴 彦

(暨南大学生物工程学系, 广州 510632)

摘要: 分析了二氧化氯 (1.0、1.5、2.0、2.5 mg L⁻¹, 作用 96 h; 2.5、6.0、8.0、16.0 mg L⁻¹, 作用 60 min) 对球形棕囊藻叶绿素 a、蛋白质含量、氨基酸组成、核酸含量的影响, 用透射电镜对二氧化氯 (0.5 mg L⁻¹, 0.8 mg L⁻¹) 作用 24 h 后藻细胞形态的变化进行了观察, 以探讨二氧化氯去除赤潮藻的机理。结果表明, 二氧化氯对球形棕囊藻叶绿素 a、蛋白质、DNA 的含量均有影响。实验各组 (1.0–2.5 mg L⁻¹, 2.5–16.0 mg L⁻¹) 球形棕囊藻的叶绿素 a、蛋白质、DNA 的含量均显著低于对照。二氧化氯浓度超过 2 mg L⁻¹ 时, 球形棕囊藻的叶绿素 a、蛋白质、DNA 的含量持续降低, 氨基酸相对含量发生明显变化; 半胱氨酸、酪氨酸和赖氨酸等的相对含量明显降低, 而组氨酸、缬氨酸和苯丙氨酸则明显增加。当二氧化氯 (2.5–16.0 mg L⁻¹) 作用 3 min 后, DNA 漏出率在 13%–18% 之间; 电镜观察发现, 二氧化氯可使细胞膜破损, 引起内容物外泄。这些结果显示, 二氧化氯能以单分子形式进入细胞, 引起叶绿素、蛋白质结构的变化, 并破坏藻细胞膜系统, 最终导致藻细胞死亡。

关键词: 球形棕囊藻; 赤潮; 二氧化氯; 细胞形态

中图分类号: Q948.85

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2006)05-0427-06

Effects of Chlorine Dioxide on Contents of Chlorophyll a, Proteins and DNA in *Phaeocystis globosa*

LIU Jie-sheng*, YANG Wei-dong, ZHANG Heng, WU Yan

(Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Following the low dose of chlorine dioxide (1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mg L⁻¹) treatment of *Phaeocystis globosa* for 96 h and the high dose (2.5, 6.0, 8.0, 16.0 mg L⁻¹) treatment for 60 min, the contents of chlorophyll a, proteins, amino acids and DNA in cells were determined. Meanwhile, changes in cell morphology after 24 h treatment of chlorine dioxide (0.5 mg L⁻¹, 0.8 mg L⁻¹) was observed by transmission electron microscope. Contents of chlorophyll a, proteins and DNA in the treated *P. globosa* were lower than those in controls. In the present of chlorine dioxide over 2.0 mg L⁻¹, chlorophyll a, proteins, DNA in content and cysteine, tyrosine, lysine in relative percentage remarkably decreased, whereas histidine, valine and phenylalanine in relative percentage increased. The leakage rate of DNA was in the range of 13%–18% after treated with chlorine dioxide of 2.5–16.0 mg L⁻¹ for 3 min. We observed that the substance damaged the cell membranes, causing the leakage of cellular content. These results suggested that chlorine dioxide might deform chlorophyll a and proteins in *P. globosa* by single molecular diffusion, damage the cell membrane system by lipid peroxidation, and eventually led to the death of cells.

Key words: *Phaeocystis globosa*; Red tide; Chlorine dioxide; Cell morphology

收稿日期: 2005-12-26 接受日期: 2006-07-10

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 973 项目 (2001CB409710); 广东省科技计划项目 (2004B20501007) 资助

* 通讯作者 Corresponding author

作为氧化型杀生剂,二氧化氯已广泛应用于渔业生产、工业水处理、食品加工、自来水、蔬菜水果和肉食水产品的防腐保鲜等领域,其对细菌等微生物的抑制和杀灭机理多有研究^[1-2]。以前我们的研究^[3]发现,二氧化氯能显著抑制赤潮藻-球形棕囊藻的生长,本研究将通过二氧化氯对球形棕囊藻叶绿素 a、蛋白质、DNA 含量的影响研究,进一步探讨其对赤潮藻的杀灭机理。

1 材料和方法

1.1 藻种

实验用球形棕囊藻汕头株 (*Phaeocystis globosa*, ST strain) 由暨南大学水生研究所藻种室提供,1997 年 7 月采自饶平海域。置于温度为 $20 \pm 1^\circ\text{C}$,光照强度为 $54 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$,光暗比为 12 h : 12 h 的 LRH-250-GS 型光照人工气候培养箱中培养。培养基为 33‰ 的人工海水配成的 f/2 培养基。

1.2 叶绿素 a 与蛋白质含量的测定

取指数增长长期球形棕囊藻液 200 ml (藻密度为 $1.18 \times 10^8 \text{ cells L}^{-1}$), 依实验要求加入一定量的二氧化氯母液。低剂量组,二氧化氯终浓度分别为 1.0、1.5、2.0、2.5 mg L^{-1} ,作用 0、24、48、72、96 h;高剂量组,二氧化氯终浓度分别为 2.5、6.0、8.0、16.0 mg L^{-1} ,作用 3、6、15、30、60 min。取作用后的藻液 5 ml,加入 5 g L^{-1} 硫代硫酸钠反应 10 min。 $3\ 300 \times \text{g}$ 离心 20 min,去上清液。收集藻细胞用于蛋白质和叶绿素 a 含量的测定。

叶绿素 a 含量的测定 向离心管加入 5 ml 80% 丙酮,置 4°C 冰箱静置 24 h。室温下解冻,以 $3\ 300 \times \text{g}$ 离心 10 min;上清液测定 OD_{663} 、 OD_{645} (空白为 80% 丙酮)。叶绿素 a 含量用以下公式计算:

$$\text{Chl a} (\text{mg L}^{-1}) = 12.70\text{OD}_{663} - 2.69\text{OD}_{645}$$

蛋白质含量的测定 加入磷酸缓冲液, JY92-II 超声波细胞破碎仪(浙江宁波新芝生物科技股份有限公司)破碎后用磷酸缓冲液定容。采用考马斯亮蓝 G-250(Ultra Pure Grade, 上海华舜)法测定蛋白质含量,以结晶牛血清白蛋白 BSA(Biotechnology Grade, 上海华舜)为标准品绘制标准曲线。蛋白质含量用 mg L^{-1} 表示。

1.3 氨基酸含量的测定

取指数增长长期的球形棕囊藻 1 000 ml, 依实验

要求加入一定量的二氧化氯母液,使二氧化氯终浓度为 2.0 mg L^{-1} 。作用 24 h 后, $3\ 300 \times \text{g}$ 离心 20 min。将藻细胞移至 10 ml 离心管中,用蒸馏水洗涤, $3\ 300 \times \text{g}$ 离心 20 min (3 次)。收集藻细胞置 60°C 烘箱干燥过夜。氨基酸含量的测定采用 Waters 高效液相色谱, PICO.TAG 氨基酸分析柱。在 38°C , 流速 1 ml min^{-1} , 254 nm 波长下进行。

1.4 DNA 含量的测定

以小牛胸腺 DNA (Sigma) 为标准,绘制标准曲线。取指数增长长期的球形棕囊藻 400 ml, 依实验要求加入一定量的二氧化氯母液。使二氧化氯终浓度分别为 1.0、1.5、2.0、2.5 mg L^{-1} 。作用 0、24、48、72、96 h 后取 50 ml 藻液 $3\ 300 \times \text{g}$ 离心 20 min, 去上清液。加入蒸馏水 15 ml, 超声波破碎仪破碎后定容至 25 ml, 加入 50 μl 20 mg L^{-1} 蛋白酶 K (Merck), 37°C 水浴 1 h, 测定 OD_{260} , 从 DNA 标准曲线确定待测样品的浓度。

1.5 藻细胞 DNA 漏出率的测定^[4]

取指数增长长期的球形棕囊藻 400 ml 藻液, 依实验要求加入一定量的二氧化氯母液, 使其终浓度分别为 2.5、6.0、8.0、16.0 mg L^{-1} , 作用 3、6、15、30、60 min 后, 取 50 ml 藻液加入 5 g L^{-1} 的硫代硫酸钠反应 10 min, $3\ 300 \times \text{g}$ 离心 15 min。测定上清液 OD_{260} 值, 从 DNA 标准曲线确定样品 DNA 含量; 阳性对照加入 50 μl 20 mg L^{-1} 蛋白酶 K, 37°C 水浴 60 min。加入终浓度为 20 mg L^{-1} 二氧化氯, 按同样方法处理后测定上清液 OD_{260} 值。漏出率 = 实验样品 DNA 的含量 / 阳性对照 DNA 的含量 $\times 100\%$ 。

1.6 电镜观察

取对数生长期的球形棕囊藻藻液, 加入一定量的二氧化氯母液, 作用 24 h 后 $4\ 000 \times \text{g}$ 离心 15 min 浓缩藻细胞。沉淀物用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.2-7.4) 清洗后, 依次用 2.5% 戊二醛、1% 锇酸固定。经脱水、包埋、修剪、切片、染色后于透射电镜 (飞利浦) 下观察。

2 结果和分析

2.1 二氧化氯对球形棕囊藻叶绿素 a 的影响

图 1 显示二氧化氯对藻细胞叶绿素 a 的影响与二氧化氯剂量明显相关, 随着二氧化氯剂量的升

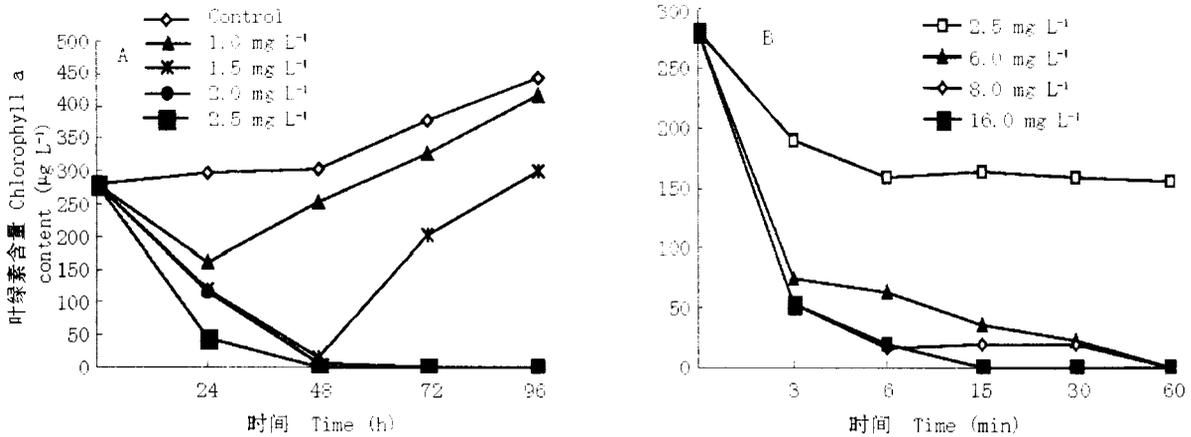


图 1 二氧化氯对球形棕囊藻叶绿素 a 含量的影响
 Fig. 1 Effects of chlorine dioxide on chlorophyll a content in *Phaeocystis globosa*
 A. 低剂量 Low dose; B. 高剂量 High dose

高, 叶绿素 a 含量减少。低剂量时, 24 h 内藻细胞叶绿素 a 显著下降。随着时间的推移, 1.0、1.5 mg L⁻¹ 组分别在 24 h、48 h 后叶绿素 a 含量开始增加; 大于 2.0 mg L⁻¹ 组叶绿素 a 含量持续降低, 96 h 趋于零。高剂量时, 叶绿素 a 含量均迅速下降; 3 min 后下降趋势趋于缓和, 藻液颜色由棕黄色变为浅绿色。其中 6.0 mg L⁻¹ 组藻细胞明显脱色, 由棕黄色变为近无色, 细胞变成空泡状小球。

2.2 二氧化氯对球形棕囊藻蛋白质含量的影响

图 2 显示, 二氧化氯对球形棕囊藻蛋白质含量的影响与其剂量明显相关。随着二氧化氯剂量的升

高, 藻体蛋白质含量明显下降。低剂量组蛋白质在 24 h 内都有一定程度的下降, 但下降幅度较小。随着时间的推移, 1.0、1.5 mg L⁻¹ 组分别在 24 h 与 48 h 后蛋白质的含量开始上升; 大于 2.0 mg L⁻¹ 组蛋白质含量持续减少。高浓度时, 各组蛋白质含量均迅速下降, 存在明显的剂量 - 效应关系。

2.3 二氧化氯对球形棕囊藻氨基酸含量的影响

表 1 列出了对照组与样品经 2.0 mg L⁻¹ 二氧化氯处理 24 h 后, 藻细胞中各氨基酸组成和含量百分比。从表 1 可知, 球形棕囊藻含有 17 种氨基酸, 二氧化氯对球形棕囊藻氨基酸组成有明显的影

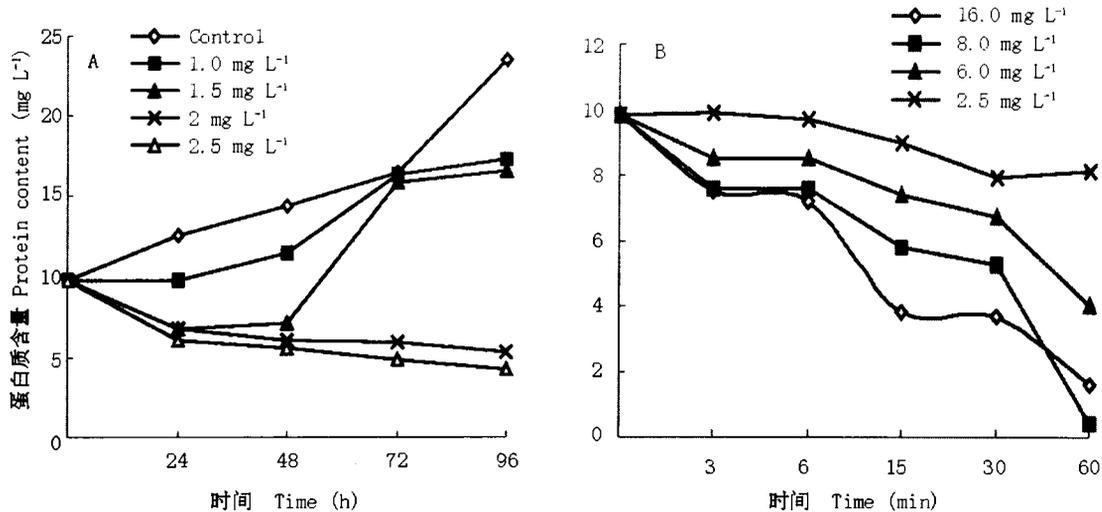


图 2 二氧化氯对球形棕囊藻蛋白质含量的影响
 Fig. 2 Effect of chlorine dioxide on protein content in *Phaeocystis globosa*
 A. 低剂量 Low dose; B. 高剂量 High dose

表 1 二氧化氯对球形棕囊藻氨基酸的影响

Table 1 Effects of chlorine dioxide on amino acid contents in *Phaeocystis globosa*

氨基酸 Amino acids	对照组 Control	实验组 Treated
	含量 Content (mg (100g) ⁻¹)	相对含量(%) Relative content
天冬氨酸 Asp	2490.42	6.73(-9.29)
谷氨酸 Glu	5244.20	14.25(-13.63)
丝氨酸 Ser	2031.55	5.98(-1.16)
甘氨酸 Gly	2148.71	6.94(8.43)
组氨酸 His	408.79	1.76(44.26)
精氨酸 Arg	2418.37	6.63(-8.04)
苏氨酸 Thr	1903.20	6.00(5.82)
丙氨酸 Ala	2916.85	8.79(1.15)
脯氨酸 Pro	2094.36	6.63(6.25)
酪氨酸 Tyr	1352.03	2.5(-37.97)
缬氨酸 Val	1772.30	5.47(35.98)
蛋氨酸 Met	1009.78	3.16(4.98)
半胱氨酸 Cys	63.28	0.12(-38.44)
异亮氨酸 Ile	1314.53	4.36(11.22)
亮氨酸 Leu	3106.55	10.67(15.23)
苯丙氨酸 Phe	1780.02	6.46(21.66)
赖氨酸 Lys	1498.65	3.52(-21.26)

括号内的数值是实验组与对照组比较, 氨基酸变化的相对百分数。Data in bracket means relative percentage changes in amino acids compared with controls.

基酸的相对含量发生了变化。其中, 相对含量减少的有天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、精氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、赖氨酸等, 半胱氨酸的减幅最大, 其次为酪

氨酸和赖氨酸。相对含量增加的有组氨酸、缬氨酸和苯丙氨酸等。

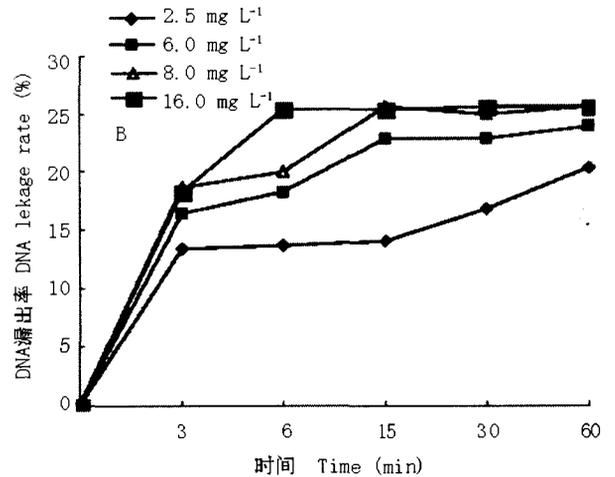
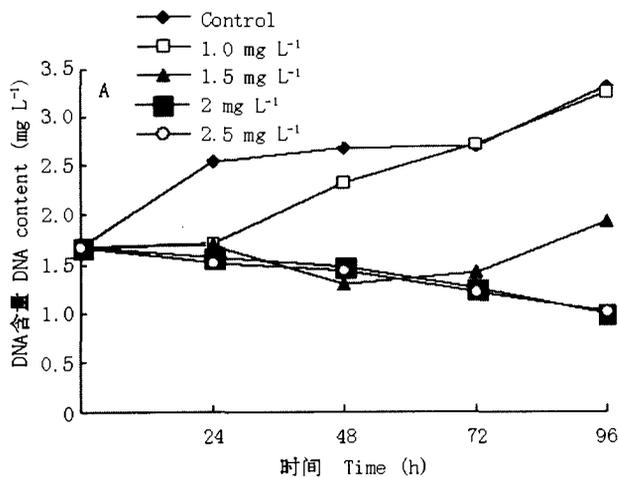


图 3 二氧化氯对球形棕囊藻 DNA 的影响

Fig. 3 Effects of chlorine dioxide on DNA in *Phaeocystis globosa*

A. 低剂量 Low dose; B. 高剂量 High dose

2.4 二氧化氯对球形棕囊藻脱氧核糖核酸(DNA)含量的影响

从图 3A 可以看出, 二氧化氯可显著减少球形棕囊藻 DNA 的含量。加入二氧化氯后 24 h 内, 各组 DNA 含量均下降, 但降幅较小。1.0、1.5 mg L⁻¹ 组分别在 24 h 与 48 h 后 DNA 的含量开始上升。大于 2.0 mg L⁻¹ 二氧化氯处理的藻液 DNA 含量随着时间的延长持续下降。

从图 3B 可以看出, DNA 漏出率与二氧化氯的浓度之间存在正相关。加入二氧化氯 3 min 后, 各浓度组 DNA 漏出率在 13%–18% 之间, 剂量大小对漏出率的影响相差不大。其后, 各组 DNA 漏出率有一定增加。提示在实验浓度范围内, 二氧化氯可直接破坏球形棕囊藻细胞膜系统, 致使细胞的屏障功能受到破坏, 造成 DNA 的漏出。DNA 漏出主要发生

在二氧化氯作用的前 3 min, 表明二氧化氯迅速破坏球形棕囊藻细胞膜的结构是导致藻细胞死亡的主要原因。

2.5 二氧化氯对藻细胞结构的影响

用透射电镜观察(图 4), 正常球形棕囊藻细胞整体结构清晰完整, 细胞膜完好无损, 细胞质比较均匀, 细胞器散落在其中。细胞核较大, 核膜完整平滑, 核、质界线明显、清晰可辨, 核仁明显, 呈网团状, 说明核增殖功能旺盛。低剂量二氧化氯作用的藻细胞, 整体显得致密暗淡、结构不清, 细胞膜与核膜发生破损。高剂量二氧化氯作用的藻细胞, 细胞膜和细胞核已经没有完整结构, 胞膜破损, 可见到有内容物外泄。细胞器大多已经破碎, 细胞核已经完全破损崩解, 胞质内只剩下大量的质地不均匀物质。

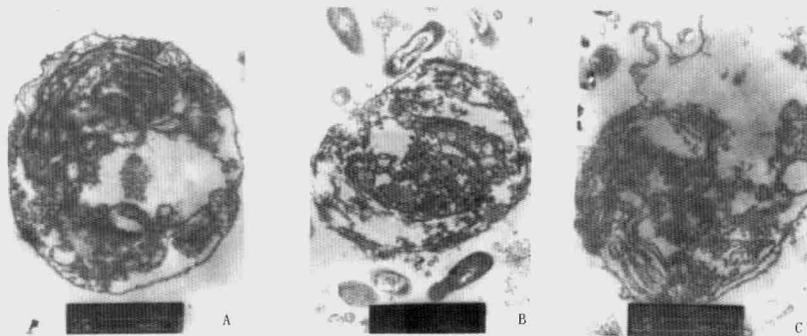


图 4 球形棕囊藻细胞透射电镜图

Fig. 4 Photographs (SEM) of *Phaeocystis globosa*

A. 正常细胞 Control; B. 0.5 mg L⁻¹ 二氧化氯作用后的细胞 Algal cell in the present of 0.5 mg L⁻¹ chlorine dioxide;

C. 0.8 mg L⁻¹ 二氧化氯作用后的细胞 Algal cell in the present of 0.8 mg L⁻¹ chlorine dioxide

3 讨论

光合作用是海洋微藻得以维持生命的能量来源, 而光合作用的关键物质是光合色素。叶绿素能够将太阳能转换为化学能并利用它将二氧化碳和水等无机物合成糖类, 同时释放氧气, 维持生物的同化作用。强氧化剂对海洋微藻叶绿素具有强烈的脱色效果, 能使微藻光合色素脱色, 使微藻无法进行光合作用, 即使在适宜生长的环境中也会很快地

死亡^[5]。本研究表明, 2.5 mg L⁻¹ 的二氧化氯在 3 min 内可使叶绿素明显脱色, 叶绿素 a 含量显著下降。提示二氧化氯分子能透过藻细胞膜, 进而氧化叶绿素 a, 造成藻类色素脱色。

蛋白质是藻细胞生命活动的主要承担者, 氨基酸是蛋白质的基本组成单位, 其组成、结构、数量不仅与藻类的生长环境、营养状态有关, 而且与藻类的光合作用、代谢作用紧密相连。稳定性二氧化氯活化时能产生较多氧自由基、羟自由基等自由基。

自由基能使微生物蛋白质中的氨基酸氧化分解,导致氨基酸链断裂,蛋白质结构和功能发生变化,最终导致细菌等微生物的死亡^[6]。研究发现,芳香族和含硫类氨基酸最易受到二氧化氯的氧化破坏,氨基酸与二氧化氯反应能力顺序为:酪氨酸>色氨酸>半胱氨酸>蛋氨酸^[7]。本研究显示,二氧化氯能使藻细胞蛋白质含量显著下降,同时使藻细胞氨基酸的相对含量发生明显变化。氨基酸相对含量的变化提示二氧化氯对不同氨基酸的氧化破坏作用不同,表现出一定的选择性。在所有氨基酸中,相对含量减幅最大的是半胱氨酸、酪氨酸和赖氨酸,提示二氧化氯与其反应的能力最强;与此相应,组氨酸、缬氨酸和苯丙氨酸等氨基酸的相对含量有一定增幅,表明二氧化氯对这些氨基酸的破坏作用很弱。研究发现,半胱氨酸是含巯基的重要化合物,巯基在体内具有清除自由基的能力,是许多蛋白和酶保护正常结构和功能的重要基团^[8];酪氨酸、赖氨酸是生物体中重要的氨基酸,在酶催化、信号传导、去除自由基等方面发挥重要的作用^[9]。可以推测,二氧化氯可选择性地作用于半胱氨酸、酪氨酸、赖氨酸等氨基酸,造成相关蛋白质结构和功能的变化,进而影响细胞的正常生理功能,引致细胞死亡。

细胞膜作为活细胞与环境之间的接口和屏障,保证胞内外物质交换有序进行,保持细胞正常的生理活动和功能。胞内成分的外渗能够反映出膜的完整性,由于 DNA 在 260 nm 波长处有强吸收,很容易通过 UV 光谱检测。因此,260 nm 波长处吸收光谱的测定已广泛用于细胞膜、核膜完整性的检测^[10]。本研究发现,二氧化氯不仅能显著减少藻细胞 DNA 的含量,而且能引致 DNA 的漏出;DNA 的漏出主要发生在二氧化氯作用的前 3 min,这些结果提示,二氧化氯能破坏球形棕囊藻细胞膜系统,造成胞内,甚至核内物质如 DNA 的外泄,二氧化氯对球形棕囊藻细胞膜的破坏作用可能是引起藻细胞死亡的主要原因之一^[11]。这一结果也得到透视电镜和叶绿素含量测定结果的证实。透视电镜观察结果显示,低剂量二氧化氯作用的藻细胞,藻体显得致密暗淡、结构不清,细胞膜与核膜发生破损。高剂量二氧化氯作用的藻细胞,细胞膜破损,细胞核发生崩解,部分细胞器破裂,可见到有胞内物外泄。

综上所述,二氧化氯分子可能以单分子扩散的形式穿透细胞膜进入胞内,氧化光合色素-叶绿素的吡咯环,破坏叶绿素的结构,使细胞脱色;其产生的自由基能氧化分解某些氨基酸,导致相关蛋白质结构和功能发生改变,从而影响细胞的正常功能。同时,自由基使藻细胞膜系统(细胞膜、细胞器膜、核膜系统)发生脂质过氧化,造成膜系统和细胞器结构的破坏,引起膜内物质的外漏,最终导致藻细胞死亡。

参考文献

- [1] Li J W, Xin Z T, Wang X W, et al. Mechanisms of inactivation of hepatitis A virus in water by chlorine dioxide [J]. *Water Res*, 2004, 38(6):1514-1519.
- [2] Huang J L, Wang L, Ren N Q, et al. Disinfection effect of chlorine dioxide on viruses, algae and animal planktons in water [J]. *Water Res*, 1997, 31(3):455-460.
- [3] Zhang H(张珩), Yang W D(杨维东), Gao J(高洁), et al. Inhibition and elimination of chlorine dioxide on *Phaeocystis globosa* [J]. *Chin J Appl Ecol(应用生态学报)*, 2003, 14(7):1173-1176.(in Chinese).
- [4] 陈春田, 李东力, 刘希真, 等. 二氧化氯作用后细菌中 DNA 漏出的实验观察 [J]. *中国公共卫生*, 2002, 8(1):57.
- [5] Wang N(王宁), Bai M D(白敏冬), Huang G B(黄桂兵), et al. Effect of hydroxyl on chl a in algae cells [J]. *J Dalian Marit Univ(大连海事大学学报)*, 2003, 29(4):59-61.(in Chinese)
- [6] 顾春英, 薛广波. 二氧化氯消毒研究进展 [J]. *上海预防医学杂志*, 1999, 11(11):495-503.
- [7] 陈聪龙, 张星, 林玉霞. 二氧化氯消毒机理的研究与应用 [J]. *医药工程设计杂志*, 2002, 23(4):17-20.
- [8] Tang L D(汤立达), Sun J Z(孙建中), Wu K(吴可), et al. Protective effects of sulfhydryl-compounds on ischemia-reperfusion induced myocardial dysfunction in isolated rat hearts [J]. *Chin J Pharm Toxicol(中国药理学和毒理学杂志)*, 2000, 5(2):96-100.(in Chinese)
- [9] 邢宇, 王幼群, 张蜀秋, 等. 酪氨酸蛋白磷酸酶可能影响 ABA 的积累和参与植物细胞水分胁迫信号传递 [J]. *科学通报*, 2003, 48(4):369-375.
- [10] Sun X X, Choi J K, Kim E K. A preliminary study on the mechanism of harmful algal bloom mitigation by use of sophorolipid treatment [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2004, 304:35-49.
- [11] Chen C T(陈春田), Li D L(李东力), Liu X Z(刘希真), et al. Study on factors influencing germicidal efficacy of chlorine dioxide [J]. *Chin J Disinfect(中国消毒学杂志)*, 2002, 19(4):208-211.(in Chinese)