

羟基杀灭盐藻细胞的效果分析

肖宇 杨波 薛晓红 毛程奇

大连海事大学 高气压强电场电离放电辽宁省重点实验室

辽宁省大连市甘井子区凌海路 1 号 116026

guaerjia@newmail.dlmu.edu.cn

摘要: 利用高气压强电离气体放电方法制取高比值浓度羟基溶液, 以盐藻为实验对象, 进行羟基杀灭压载水中微生物的实验研究。实验结果表明羟基溶液比值浓度在 1.24mg/L 时, 对盐藻细胞杀灭达到 95.8%; 盐藻的叶绿素 a 和叶绿素 b 衰减率分别为 94.8%、97.2%, 脂质过氧化物含量上升为原来的 3 倍; 抗氧化酶系(氧化物酶、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶)的含量也都降低, 基于实验结果进行分析, 羟基具有强氧化性, 对盐藻的光合色素、脂质、抗氧化酶系均有强烈的破坏作用, 对细胞造成致命的伤害。

关键词: 羟基; 盐藻细胞; 光合色素; 脂质; 抗氧化酶系;

压载水的排放被认为是造成地理性隔离水体间的有害生物传播的最主要途径, 引起排放地水域灾难性的后果已引起全世界的极大关注^[1-3]。不少科技工作者进行了诸如加热、紫外线照射、加入 H₂O₂ 等方法处理压载水, 防治外来生物入侵的研究工作^[4-7]。但是 MEPC 以及 GloBallast 却认为当前尚无一种行之有效的治理压载水的方法^[8]。

羟基具有极强的氧化能力, 与氟的氧化能力相当, 参与反应是属于游离基反应, 反应速度快, 能很容易地氧化分解各种有机物和无机物, 剩余羟基最终生成物是 O₂ 和 H₂O, 无剩余污染^[9, 10], 是许多高级氧化工艺(Advance Oxidation Process, AOP)如: 湿式空气氧化法、超临界水氧化法、光化学氧化法、电化学氧化法、声化学氧化法及相应的催化氧化法的氧化主体^[11-13]。

白希尧等利用高气压强电离气体放电方法制取高比值浓度羟基溶液, 进行了处理压载水的研究, 并取得了显著的成果^[14, 15]。本文基于以上研究, 以盐藻为实验对象, 讨论羟基对盐藻细胞的杀灭效果。

1 实验材料和方法

1.1 实验材料

海水取自大连港池过滤海水, 经 0.45 μ m 滤膜过滤消毒, 冷却后配置 f/2 营养盐。盐藻 (*Dunaliella* spp.) 藻种由辽宁省海洋水产研究所提供, 藻种使用前经分离、纯化后,

在 XYZ—250D 型震荡数显光照培养箱中进行培养。培养温度控制在 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，pH 值 7.2，光照强度 2600lx，光期：暗期=10：14，将盐藻培养到 $10^5/\text{ml}$ 数量级。

实验用 OH^{\cdot} 溶液是由羟基溶液产生装置以 O_2 、 H_2O 为原料加工而成，羟基的气液比为 0.12，其羟基比值浓度达到 8.0mg/L。

1.2 实验方法

羟基溶液制取的实验系统流程如图 1 所示。氧气由大连气体总公司提供，纯度为 99.5%，加湿后通入到系统中，由 LZJ10 转子流量计 2 控制气体流量，将高频高压施加到放电极上，在羟基产生单元 3 中形成强电离放电（折合电场强度 E_d 为 410Td、频率为 10kHz），发生等离子体化学反应，产生 OH^{\cdot} 等活性粒子^[14]，高浓度 OH^{\cdot} 通入到气液溶解单元 9 中充分溶解，形成高比值浓度的羟基溶液，未溶解气体由气液分离器 10 分离并消除。

实验时加入羟基溶液处理后放置 30min 测定各项指标，实验均重复做 3 次，取其平均值表征实验结果。海洋微藻杀灭效果是在显微镜下用血球计数板直接计数；光合色素的测定方法按海洋检测规范（GB17378.7）的分光光度法进行；脂质过氧化采用硫代巴比妥酸（TBA）法测定丙二醛（MDA）的含量；超氧化物歧化酶（SOD）活性测定采用 Marklund 建立的经典连苯三酚法；过氧化氢酶（CAT）的测定采用钼酸铵比色法；氧化物酶（POD）的测定采用 Chance 等建立的，Srivastava 改进的愈创木酚法测定。

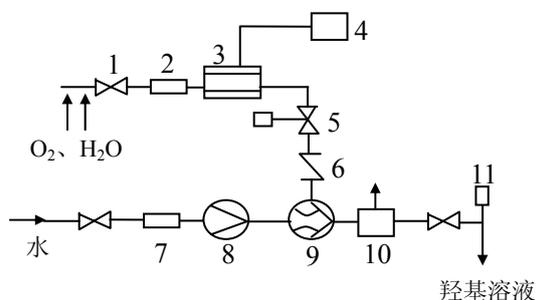


图 1. 羟基溶液制取工艺流程

注：1—阀，2—气体流量计，3—羟基产生单元，4—高频高压电源，5—电磁阀，6—止回阀，

7—液体流量计，8—泵，9—溶解装置，10—气液溶解分离器，11—羟基比值浓度测试仪

2 实验结果

2.1 羟基对盐藻的杀灭实验

表 1 羟基对盐藻的杀灭实验结果

羟基比值浓度 (mg/L)	0	0.31	0.62	0.93	1.24
盐藻细胞数目 (/ml)	2.4×10^5	2.3×10^5	1.1×10^5	3×10^4	1×10^4

实验取样，用血球计数板进行计数。如表 1 所示，实验结果表明羟基对实验海水中盐藻的杀灭效果很明显。当羟基比值浓度达到 0.62mg/L 时，在溶液中已经检测不到活

的藻细胞，并且密度迅速减小；当羟基溶液比值浓度达到 1.24mg/L 时，致死率已经达到 95.8%；放置 24h 后再次镜检，未发现微藻细胞有复活或复苏的现象。表明羟基的强氧化性杀死并分解盐藻细胞。

2.2 羟基对叶绿素含量的影响

叶绿素是微藻重要的光和色素，它是推算初级生产力和生物量的主要指标，也是海洋检测的重要指标。仅测定细胞的存活还不能全面说明羟基药剂对海洋微藻的杀灭效果，为此，我们进一步测定了受试藻类的叶绿素 a、b 变化。

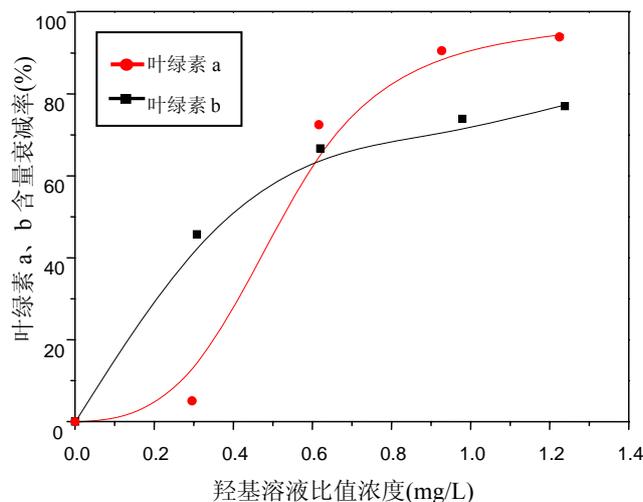


图 2 羟基与盐藻叶绿素 a、b 含量变化的关系曲线

当羟基比值浓度达到 0.62mg/L 时，盐藻叶绿素 a 的衰减率达到 73.8%，而当羟基比值浓度为 1.24mg/L 时，盐藻的叶绿素 a 衰减率达到 94.8%。从图中曲线可见，羟基对叶绿素 b 的影响的规律基本上与羟基对叶绿素 a 作用规律相似，当羟基比值浓度为 1.24mg/L 时，盐藻的叶绿素 b 衰减率达到 97.2%。以上实验结果说明羟基不仅杀死和分解藻细胞，而且分解叶绿素，使其不能进行光合作用，导致藻类死亡。

2.3 羟基对盐藻膜脂过氧化程度的影响

盐藻细胞的基本结构和功能单位是细胞，细胞的薄膜厚度为 4—7nm，它把细胞的内含物与环境隔开，是分隔细胞内外环境的重要屏障，膜的通透性和选择性运输是维持生命的重要基础。膜脂质过氧化而导致膜的破碎，使细胞内含物外泄，致使细胞死亡。

MDA 是膜脂氧化的产物，含量高低可反映细胞膜脂过氧化程度。如图 3 所示，羟基比值浓度小于 0.27mg/L 时，盐藻的 MDA 含量基本保持不变，随着羟基比值浓度的升高，MDA 含量迅速增加，当羟基比值浓度为 1.36mg/L 时，盐藻细胞的 MDA 含量上升了三倍多。说明羟基使盐藻细胞的膜脂过氧化程度加剧，导致细胞受到严重伤害，但

是在相对低的浓度下膜脂过氧化程度变化不大。

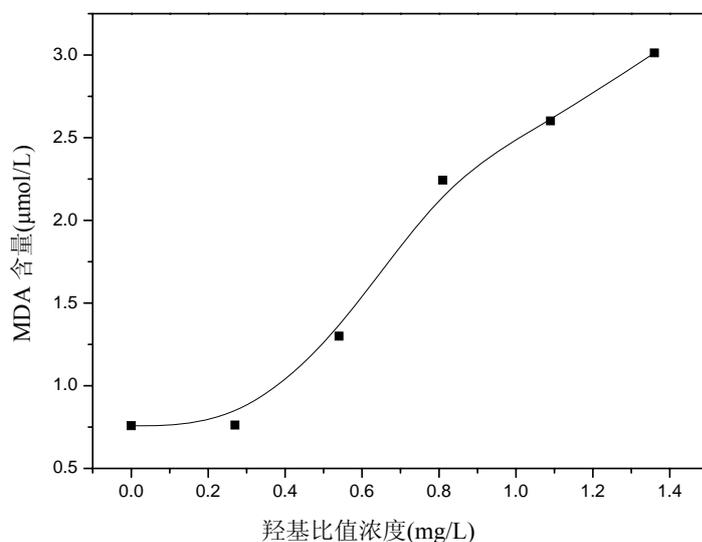


图3 羟基对盐藻 MDA 含量的影响

2.4 羟基对盐藻抗氧化酶活性的影响

需氧生物为了正常生长，必须有效地清除由正常代谢及各种外在环境胁迫所产生的自由基，抗氧化作用的保护酶能够转移、消灭自由基及中间产物。抗氧化酶系统主要有超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化氢酶（CAT）、氧化物酶（POD）等，CAT 和 POD 能有效地清除 H_2O_2 ，SOD 能清除 $O_2^{\cdot-}$ 。CAT 和 SOD 是最有效的抗氧化酶，二者协同作用能将 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 转化为 H_2O 和 O_2 ，减少细胞受到的伤害。因此 SOD 和 CAT 的联合行为能抗拒大多数有害的、极具活性的氧自由基的形成。

抗氧化酶活性随着羟基比值浓度的增加发生了很明显的变化。如图 4 所示，SOD 随着羟基比值浓度的增加而增加，当羟基比值浓度为 0.54mg/L 时，SOD 有最大的活性，然后随着羟基比值浓度的增加，迅速下降，当比值浓度为 0.82mg/L 时，下降为零。如图 5 所示，POD 也有同样的变化趋势，不过其活性最大时羟基比值浓度为 0.27mg/L。需要说明的是 CAT 活性不是先上升后下降，而是迅速下降的过程，如图 6 所示。

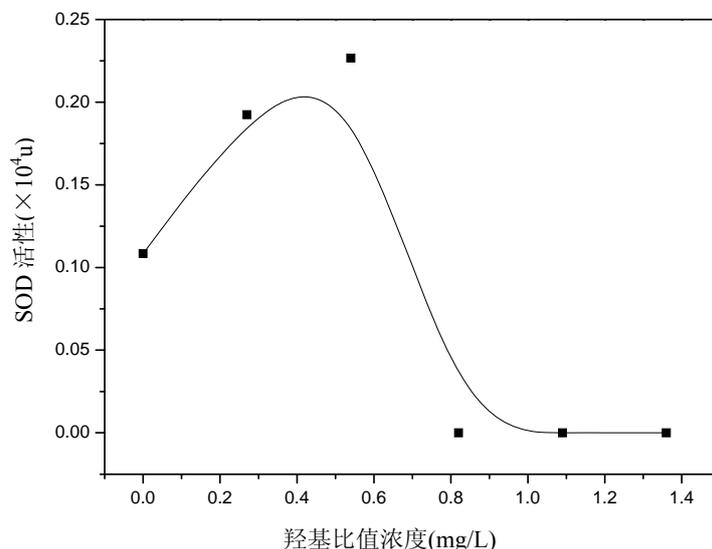


图4 羟基对盐藻 SOD 活性的影响

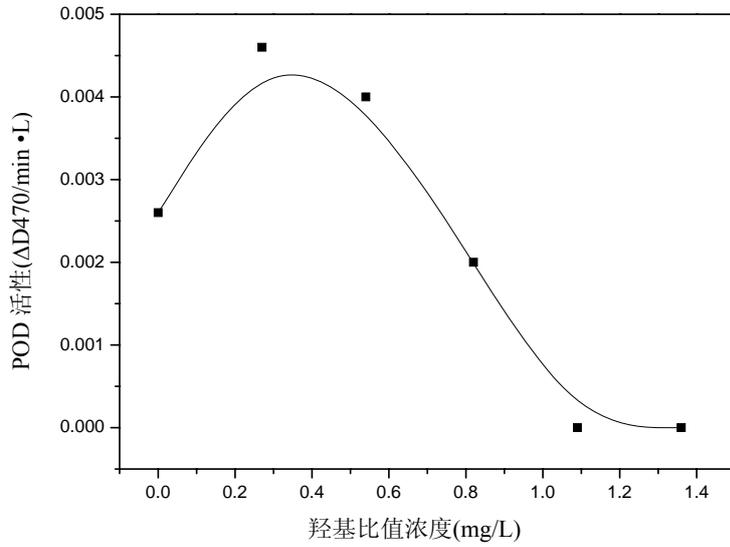


图5 羟基对盐藻 POD 活性的影响

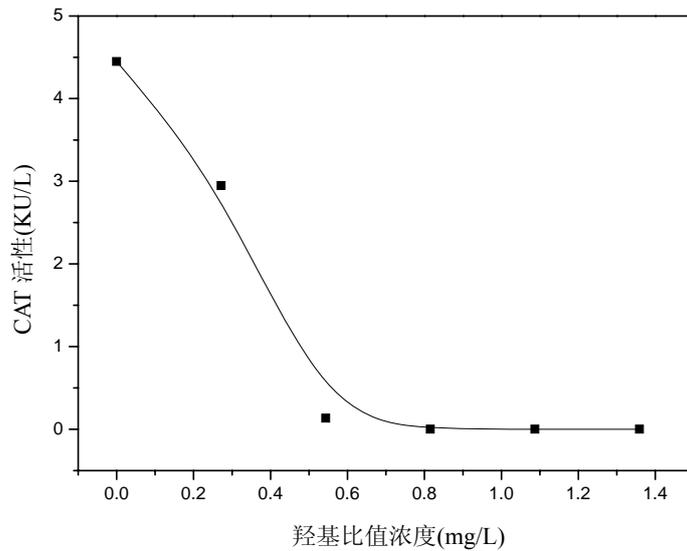


图6 羟基对盐藻 CAT 活性的影响

3 实验效果分析

显微镜下的照片，如图9所示，证实了羟基药剂破坏、分解微藻细胞的现象。处理前的盐藻细胞边缘圆滑，细胞形状规则，处理后的盐藻细胞则有明显的破裂、缺失以及细胞内容物外泄的现象。羟基具有不配对电子，具有极高的化学活性，是强氧化剂，迅速与相邻的物质迅速反应。照片中显示，盐藻的细胞壁，细胞膜等外层蛋白质被氧化，使胞内有机物外泄，致使细胞的死亡。还有一些细胞形态发生变化（例如增大和缩小）和某些细胞器的丢失。这些损伤对于盐藻来讲，都是致命的。

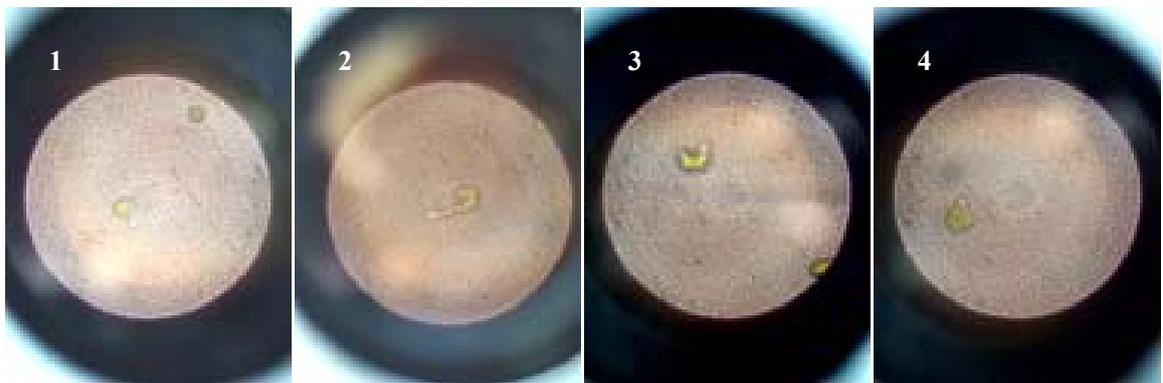
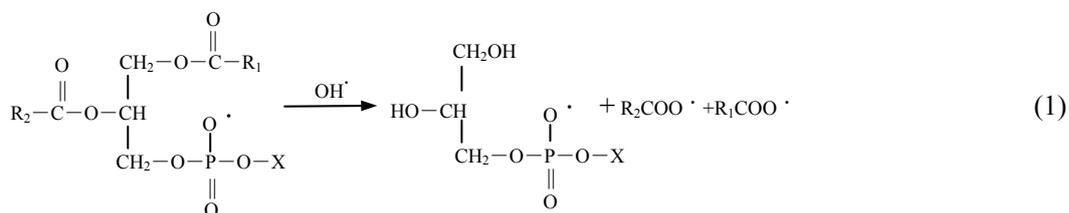


图9 羟基对盐藻的物理伤害

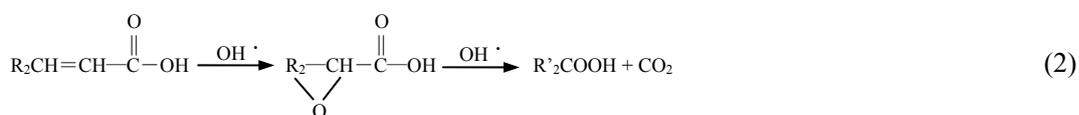
注：1为盐藻处理前的照片，2、3、4为盐藻处理后的照片

羟基具有强氧化性，有强烈的脱色效果，能够使海洋微藻的光合色素脱色，无法进行光合合成，即使在适宜生长的环境中也很快地死亡。叶绿素 a 是单、双键交替的不饱和结构组成的，极易受 OH^\cdot 作用，发生氧化、断裂、变构和分解等生化反应。叶绿素 b 是微藻表观色素，是主要的辅助色素，也是多键和单键交替的不饱和结构，极易受羟基氧化、分解，导致藻死亡。

细胞中膜脂过氧化主要指两个方面：一是细胞膜的膜脂过氧化，二指原生质中细胞器的膜脂过氧化。氧自由基学说认为：在正常的新陈代谢过程中，植物体内自由基的产生和清除呈现动态平衡，植物膜脂过氧化程度很低。当植物体处于逆境条件时，由于环境因子的胁迫，细胞内自由基产生和清除的平衡会遭到破坏，向有利于产生的方向，植物体内的活性氧如羟基 (OH^\cdot)、超氧自由基 (O_2^\cdot)、单态氧 ($^1\text{O}_2$)、过氧化氢 (H_2O_2) 等产物显著增加，积累的自由基会对植物的细胞造成伤害。首先易于遭受攻击的便是膜系统，膜内拟脂双分子层中含有的不饱和脂肪酸链易被过氧化分解而造成整体膜的破坏，如式 (1) 所示：



— R_2 链中含有不饱和键，羟基把其中的不饱和键氧化，如式 (2) 所示，由于活性羟基是强氧化剂，所以反应最终将羧酸脱羧生成 CO_2 、 H_2O 。



膜的过氧化反应会导致膜透性加大, 内含物泄漏, 细胞缩水; 细胞内膜的伤害会影响线粒体的呼吸作用, 引起色素损伤, 叶绿体固定 CO₂ 能力的丧失等, 最终导致细胞死亡。

在低浓度羟基溶液胁迫下, 盐藻体内活性氧代谢平衡受到影响, 活性氧累积越来越多, SOD、POD 等抗氧化酶由于底物浓度增加而被诱导加速生物合成, 以期清除活性氧, 重新达到平衡, 表现为活性的升高。然而, 当羟基比值浓度较高时, 细胞结构和酶体系遭到破坏, 抗氧化酶系统功能下降, 表现为酶活迅速下降。而 CAT 是胞外酶, 羟基又属于强氧化剂, 反应速度极快 (参与生化反应的时间仅为 1s~10s), 胞内合成 CAT 的速度不足以抵抗羟基的氧化, 被迅速分解。

膜脂过氧化程度与抗氧化系统的酶促和非酶反应对活性氧清除的动态平衡有密切的关系。由实验结果可以看出: 当细胞受到胁迫时, SOD、POD 活性升高, 清除体内的活性氧, 体外的 CAT 首先与羟基反应, 阻抑膜脂过氧化, 保护细胞膜系统。然而, 随着羟基比值浓度的增加, 细胞内活性氧积累超过一定的限度, 再加上羟基的氧化作用, 加速了细胞体内活性氧的积累, 造成细胞膜和酶系统的破坏, SOD、CAT、POD 活性迅速下降, 膜脂过氧化程度加剧。对藻类细胞的正常生理机能造成十分不利的影响。

4 结论

利用介质阻挡强电离放电制取羟基溶液杀灭盐藻的效果是很明显的。羟基浓度达到 1.24mg/L 时, 就可以杀死和分解盐藻细胞, 致死率达到 95.8%; 并分解叶绿素 a、b, 衰减率分别为 94.8%、97.2% , 破坏其光合作用的能力。

羟基对盐藻细胞的伤害主要是氧化外层细胞组织, 对脂质、抗氧化酶系均有强烈的破坏作用, 脂质过氧化物含量上升为原来的 3 倍, 使内含物外泄, 造成细胞形态变化以及细胞器的丢失, 对细胞造成致命的伤害, 抗氧化酶系含量都明显减少, 当羟基比值浓度达到 1.24mg/L 时, 三种酶的含量几乎为零, 说明抗氧化系统都已经基本崩溃, 这些伤害对微藻来说是致命的。

参考文献

- [1]全球压载水管理项目中国国家项目实施小组. 全球更换压载水管理项目[J]. 交通环保, 2001, 专版: 1-4.
- [2]Gregory M, Ruiz. Global spread of microorganisms by ships[J]. Nature, 2000, 408: 49-50.
- [3]Mackenzie. Alien invaders. New Scientist[J]. 1999, 162: 18-19.
- [4]Geoff Rigby. From ballast to Bouillabaisse[J]. Science, 2000, 289: 241.
- [5]孙永明. 紫外线技术处理船舶压载水的可行性研究[J]. 上海海运学院学报, 2002, 23(2): 22- 25.
- [6]Alan M. Kuzirian, Eleanor C. S. Terry, Deanna L. Bechtel et al. Hydroxyl peroxide: An effective treatment for ballast water[J]. Biol Bull, 2001, 201: 297-299.

- [7] 依成武, 白敏葭, 沈欣军, 等. 治理压载水微生物入侵性传播方法的研究进展[J]. 海洋科学, 2004, 28 (3): 55—58.
- [8] Fraser J. A. L. Hydrogen peroxide in municipal, landfill and industrial effluent treatment[J]. Effluent Water Treat J. 1984, 24(5): 184-188.
- [9] Donald M A. Turning back the harmful red tide[J]. Nature, 1997, 388: 513-514.
- [9] Penemrante BM, Bardsley J N, Hsiao M. Kinetic analysis of nonthermal plasma used for pollution control[J]. J Appl Phys, 1997, 36: 5007-5016.
- [10] 邓淑芳, 白敏冬, 白希尧, 刘兴旺. 羟基自由基特性及其化学反应[J]. 大连海事大学学报, 2004, 30 (3): 62—64.
- [11] 曾昭惠, 张宗玉. 自由基对线粒体的氧化损伤与衰老[J]. 生物化学与生物物理进展, 22(5), 1995: 429-431.
- [12] 张乃东, 郑威. 羟自由基 OH^\bullet 在水处理中的应用[J]. 哈尔滨商业大学学报, 2001, 17(3): 22-24.
- [13] 白希尧, 白敏冬, 周晓见. 外来生物入侵性传播灾害和治理方法的研究[J]. 自然杂志, 24(5), 2002: 223-226.
- [14] 白敏冬, 张芝涛, 白希尧, 周晓见, 邓淑芳, 王宁. 羟基游离基杀死压载水中微生物研究[J]. 海洋与湖沼, 2003, 34(5): 484-489.
- [15] 白希尧, 周晓见, 白敏葭, 杨波. 加工羟基的等离子体化学反应过程[J]. 大连海事大学学报, 2002, 28(2): 56-58.