

十六烷基三甲基溴化铵对蛋白核小球藻的毒性效应

郑香娇, 周作明*

(华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

摘 要:以蛋白核小球藻为受试物, 分别设 0(CK)、0.06、0.12、0.18、0.24、0.30、0.36 mg/L 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)处理, 考察 CTAB 对藻生长和生化指标的影响, 分析其致毒机理。结果表明: CTAB 对蛋白核小球藻 96 h EC_{50} 值为 0.17 mg/L; 藻细胞叶绿素 a、水溶性蛋白质含量及超氧化物歧化酶(SOD)活性随 CTAB 浓度增加呈先升后降趋势, 当 CTAB 剂量 0.06 mg/L 时, 叶绿素 a 含量略微上升, >0.06 mg/L 时, 叶绿素 a 含量急剧下降; CTAB 剂量 0.24 mg/L 处理下蛋白质含量增加, CTAB 剂量 0.30 mg/L 处理时水溶性蛋白含量低于对照组; 除剂量 0.06 mg/L 处理外, SOD 活性随 CTAB 剂量的增大呈下降趋势; 脂质过氧化丙二醛(MDA)含量则随 CTAB 浓度增加逐渐上升; CTAB 对蛋白核小球藻的致毒机理为通过破坏细胞膜完整性, 抑制 SOD 活性, 导致 MDA 含量持续上升。

关 键 词:蛋白核小球藻; 十六烷基三甲基溴化铵; 毒性; 致毒机理

中图分类号: X171.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2012)01-0027-05

Toxic effects of the cetyltrimethylammonium bromide on *Chlorella pyrenoidosa*

ZHENG Xiang-jiao, ZHOU Zuo-ming*

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen, Fujian 361021, China)

Abstract: The toxicity of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) on the growth and biochemical indicators of algae was studied by taking *Chlorella pyrenoidosa* as the test organism. The results showed that 96 h EC_{50} of CTAB on *Chlorella pyrenoidosa* was 0.17 mg/L; algal chlorophyll, protein content and Superoxide Dismutase (SOD) activity first increased and then decreased, the content of algal chlorophyll and activity of SOD rose slightly in low concentrations of CTAB (≤ 0.06 mg/L) and decreased dramatically in a higher concentration (> 0.06 mg/L); when the dosage of CTAB ≤ 0.24 mg/L, the protein content increased, however it decreased obviously with a higher addition of CTAB (≥ 0.30 mg/L); lipid peroxidation malondialdehyde (MDA) content rose gradually with the increase of CTAB concentrations. According to 5 kinds of active parameter variation rules and the measured results of algal cell apoptosis by flow cytometric apparatus, it was speculated that CTAB first destroyed the integrity of the cell membrane, thereby inhibited the SOD activity, leading to the MDA content rising continually. Therefore, the restrained SOD activity leading to peroxidation of the membrane lipid may be the main reason CTAB causes toxicity on *Chlorella pyrenoidosa*.

Key words: *Chlorella pyrenoidosa*; cetyltrimethylammonium bromide(CTAB); toxicity; mechanism of toxication

表面活性剂广泛应用于工业生产及日常生活, 但过多排入水体将影响环境生态系统^[1], 进而破坏水体自净功能。十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)是一种典型阳离子表面活性剂, 其大量使用导致的健康问题和环境危害已受到社会广泛关注^[2-3]。近年来,

已有关于 CTAB 对环境生态的危害及其致毒机理的众多研究^[4-5]。蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)是水生生态系统的初级生产者, 对环境变化敏感, 是常用的毒性指示物种^[6], 也是中国推荐的环境监测试验藻种^[7]。笔者研究了 CTAB 对蛋白核小球藻

收稿日期: 2011-09-19

基金项目: 长江水环境教育部重点实验室开放基金项目(YRWEF201003); 华侨大学科研基金项目(11BS119, JB-ZR1111)

作者简介: 郑香娇(1987—), 女, 福建平潭人, 硕士研究生, 主要从事环境生物技术和环境毒理研究, zhengxiangjiao163@163.com;

*通信作者, zzm1975@126.com

的生长及叶绿素 a 含量、水溶性蛋白质含量、MDA 含量、SOD 活性的影响,并对其细胞凋亡情况进行了测定,分析了 CTAB 对蛋白核小球藻的毒性效应,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

蛋白核小球藻(由中国科学院淡水藻种库提供);无菌培养基^[7];CTAB($C_{16}H_{33}(CH_3)_3NBr$,纯度大于 99%,由先端科技公司提供);SOD 试剂盒和 MDA 试剂盒(购自建成生物公司);Hoechst33342-PI 双染试剂盒(购自凯基生物公司);其余试剂均为分析纯,用前未经预处理。

1.2 主要仪器与设备

主要仪器设备有分光光度计(752,上海光谱)、显微镜(CX41RF,奥林巴斯)、智能人工气候箱(RXZ260B,宁波东南)、超声波细胞破碎仪(JY92-2,宁波新芝)、叶绿素荧光仪(OS-30,美国 Optiscience)、分选型流式细胞仪(FACSVantage SE,美国 BD)、场发射扫描电镜(SUPRA 40,北京普瑞赛司)。

1.3 藻种培养

蛋白核小球藻于水生 4 号无菌培养基^[8]中扩大培养,采用 4 层无菌纱布封口后置于人工气候箱内,培养温度为 $(25\pm 1)^\circ C$,光照度约 3 000 lx,每天光照培养 12 h,黑暗培养 12 h,静置培养,每隔 6 h 摇动 1 次,并随机更换容器位置,藻体细胞浓度达 1×10^6 个/mL 时停止培养。藻细胞在对数生长期反复接种 3 次后进行试验,移种前显微观察藻液是否被污染。

1.4 藻类生长抑制试验

采用 OECD201 藻类生长抑制试验^[7]确定 CTAB 对蛋白核小球藻生长抑制的 96 h EC_{50} 值。经预备试验确定 96 h EC_{50} 约 0.15 mg/L。分别设置 0(CK)、0.06、0.12、0.18、0.24、0.30、0.36 mg/L 7 个 CTAB 剂量处理组,每处理设 3 个重复,分别于处理后 0、24、48、72、96 h 对藻细胞进行计数,绘制各处理组蛋白核小球藻生长曲线,与对照组进行比对,确定 CTAB 对蛋白核小球藻的 96 h EC_{50} 值。于 96 h 取样测定蛋白核小球藻细胞的叶绿素 a 含量、水溶性蛋白质含量、MDA 含量和 SOD 活性。

1.5 测定项目与方法

藻体细胞浓度采用血球计数板显微计数法^[9]测定;叶绿素 a 含量采用叶绿素荧光仪(OS-30)测定;水溶性蛋白质含量采用考马斯亮兰法^[10]测定,以小牛血清蛋白为参比作标准曲线;SOD 活性的测定采用 SOD 试剂盒^[11];MDA 含量的测定采用 MDA 试剂盒^[12]。

藻细胞表面结构观察:①采用 2.5%戊二醛固定 2 h,制成藻的细胞悬液备用;②采用 0.5%Formvar 氯仿溶液滴于 1 cm^2 的盖玻片上,30 s 后倾斜玻片去除多余液体;将藻悬液滴于其上,静置 30 min,用滤纸吸去上清液,采用乙醇脱水后以醋酸异戊酯置换;③冷冻干燥 24 h,采用离子溅射镀膜,于 SUPRA 40 扫描电镜($\times 75\ 000$)下观察。

藻细胞凋亡的测定及分析采用流式细胞仪^[13]。通过流式细胞仪能将正常细胞、凋亡细胞和坏死细胞区别开。在流式细胞术中,先进行 Hoechst33342 活细胞染色,再进行 PI 染色,并和细胞光散射性质结合进行细胞形态学分析,检测藻细胞在 0、0.5 倍 EC_{50} 、1.5 倍 EC_{50} 的 CTAB 剂量下胁迫 96 h 的凋亡情况,步骤如下:①将 $10^5\sim 10^6$ 个细胞悬浮于 1 mL 培养基中,加入 10 μL Hoechst 33342 染液,混匀, $37^\circ C$ 孵育 5~15 min;②细胞于 $4^\circ C$,500~1 000 r/min 离心 5 min 后弃去上清液;③加入 1.0 mL Buffer A 工作液悬浮细胞,加入 5 μL PI 染液,室温避光放置 5~15 min 后混匀;④流式细胞仪分析,在激发光波长为 488 nm 下得到 PI 单染峰形图,在激发光波波长为 352 nm 和 488 nm 下得到 Hoechst33342 和 PI 双参数图,以前向散射(FSC)和侧向散射(SSC)作参数,得到 SSC-FSC 二维散点图。

1.6 数据处理

数据处理采用 Excel 2003 软件;采用 SPSS14.0 软件进行 t 检验。

2 结果与分析

2.1 不同剂量 CTAB 处理对蛋白核小球藻生长的影响

从图 1 可知,当 CTAB 剂量 0.24 mg/L,蛋白核小球藻在最初 24 h 内生长受到明显抑制,剂量为 0.36 mg/L 时抑制率高达 49.38%;随着处理时间的延长,各剂量组蛋白核小球藻数量呈增加趋势,但均小于对照组;处理 96 h,0.24、0.30 mg/L 剂量组的藻细

胞浓度均与对照组差异显著($n=3$, $P<0.05$), 0.36 mg/L 剂量组的藻细胞浓度与对照组差异极显著($n=3$, $P<0.01$), 剂量效应关系明显。由试验数据计算得, 96 h EC_{50} 值为 0.17 mg/L, 由此可知, CTAB 属于极高毒性物质^[14]。

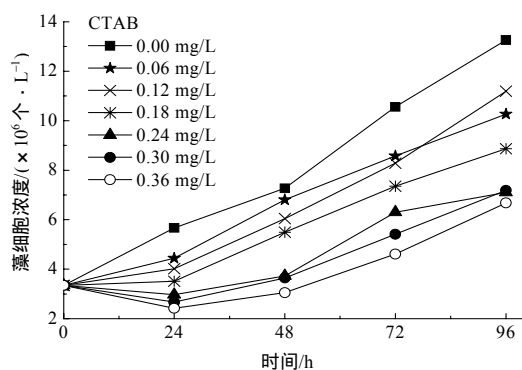


图 1 CTAB处理下的蛋白核小球藻细胞浓度

Fig.1 Effects of CTAB on the growth of *Chlorella pyrenoidosa*

2.2 不同剂量 CTAB 处理 96 h 对蛋白核小球藻细胞内含物的影响

2.2.1 对叶绿素 a 含量的影响

从图 2 可知, CTAB 处理 96 h, 蛋白核小球藻叶绿素 a 含量随 CTAB 剂量增加呈下降趋势; 剂量大于 0.12 mg/L 时, 叶绿素 a 含量与 CTAB 剂量显著相关, CTAB 剂量为 0.24、0.30、0.36 mg/L 的藻细胞叶绿素 a 含量比对照组分别减少 54.38%、69.56% 和 82.74%, 差异显著($n=4$, $P<0.05$), 说明 CTAB 可能造成藻细胞内叶绿素 a 结构破坏或抑制其合成。

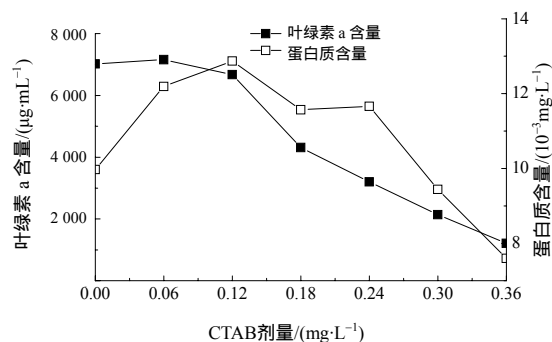


图 2 CTAB 处理蛋白核小球藻 96 h 的叶绿素 a 和水溶性蛋白质含量

Fig.2 Effects of CTAB on the chlorophyll a content and the protein content of *Chlorella pyrenoidosa*

2.2.2 对水溶性蛋白质含量的影响

由图 2 可知, CTAB 高剂量(>0.12)处理下蛋白

质含量减小, 低剂量(0.12 mg/L)处理下蛋白质含量增加。CTAB 低剂量组处理的藻细胞水溶性蛋白含量高于对照组, 其中, 剂量为 0.12 mg/L 的 CTAB 处理, 水溶性蛋白质含量为对照组的 1.29 倍; CTAB 剂量 0.30 mg/L 处理的水溶性蛋白质含量低于对照组, 0.36 mg/L 时单位细胞水溶性蛋白质含量仅为对照组的 0.76 倍。

2.2.3 对 SOD 活性和 MDA 含量的影响

由图 3 可知, 除剂量 <0.06 mg/L 处理外, SOD 活性随 CTAB 剂量的增大呈下降趋势。不同剂量组蛋白核小球藻 SOD 活性差异显著($P<0.05$), 0.06 mg/L 剂量处理 96 h SOD 活性为 7.984 U/g, 为对照组的 1.05 倍; 0.36 mg/L 剂量处理则为 5.322 U/g, 为对照组的 70.13%。

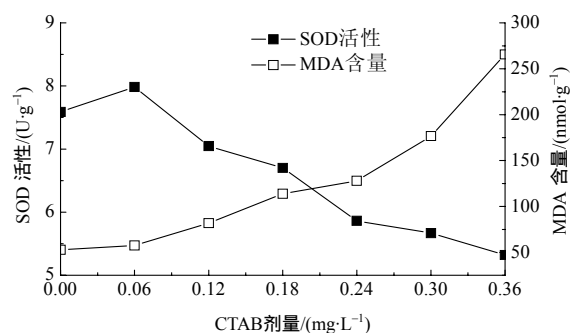


图 3 CTAB 处理蛋白核小球藻 96 h 的 SOD 活性和 MDA 含量

Fig.3 Effects of CTAB on the activity of superoxide dismutase (SOD) and the MDA content of *Chlorella pyrenoidosa* after 96 h

藻细胞 SOD 活性下降, 其抗氧化能力降低, 将导致 MDA 含量逐渐上升。由图 3 可知, MDA 含量的变化与 SOD 活性变化呈负相关(CTAB 剂量 <0.06 mg/L 除外), 藻体内 MDA 含量随 CTAB 剂量增大而不断提高。与对照组相比, 低剂量时(0.06 mg/L)增大不显著, 其他各剂量组 MDA 含量差异极显著($P<0.01$)。MDA 含量与 CTAB 剂量的相关性间接证实了 CTAB 通过对小球藻 SOD 活性的抑制, 引起其膜脂过氧化而产生毒害。

2.3 CTAB 对蛋白核小球藻细胞膜的影响

试验中观察到, CTAB 作用前藻细胞呈圆球形, 表面光滑平整, 细胞间联系紧密, 分布有规律; 作用后藻细胞壁通透性明显改变, 表面出现褶皱, 且结构不均匀(图 4), 说明 CTAB 先使藻细胞壁通透性增加, 而表面活性剂易被具有膜层结构的藻细胞

表面吸附^[15], 当其吸附在细胞膜表面时, 引起膜蛋白疏水性发生变化, 削弱了保证半透膜完整的蛋白

质的黏物能力, 导致膜功能破坏, 进而影响和破坏藻细胞正常的生理功能。

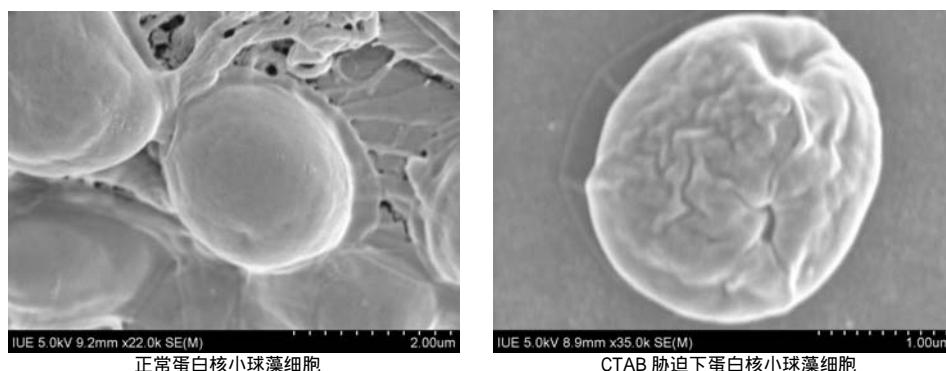


图 4 正常状态与 CTAB 胁迫后蛋白核小球藻细胞的电镜扫描结果

Fig.4 Photographs (SEM) of normal and CTAB impacted *Chlorella pyrenoidosa* cells

2.4 蛋白核小球藻细胞凋亡分析

从图 5 可知, 与 A_0 相比, A_1 、 A_2 在直方图上没有亚二倍体峰(凋亡峰)出现, 说明无凋亡细胞; A_1 、 A_2 荧光信号脉冲最大高度和荧光信号脉冲面积无明

显变化, 但荧光信号脉冲宽度明显变大, 三者大小依次为 A_2 、 A_1 、 A_0 , 说明在 CTAB 作用下出现了多种差异细胞, 蛋白核小球藻细胞出现坏死现象。

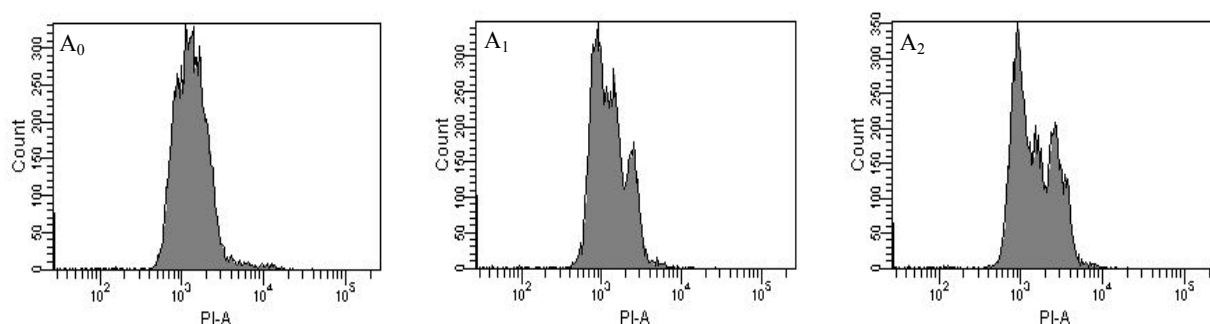


图 5 CTAB 处理 96 h 后 PI 单染峰形
 Fig.5 PI single-stained peak shape graphs in the presence of CTAB after 96 h

采用 Hoechst 33342 与 PI 双染后, 通过流式细胞仪检测。由图 6 可以看出, A_0 为正常生长细胞, 其细胞都集中在 Q3 正常细胞区域, 与事实相符合;

A_1 、 A_2 细胞荧光强度都向 Q4 区发生了漂移, 说明藻细胞在 CTAB 作用下, 出现了细胞坏死现象。

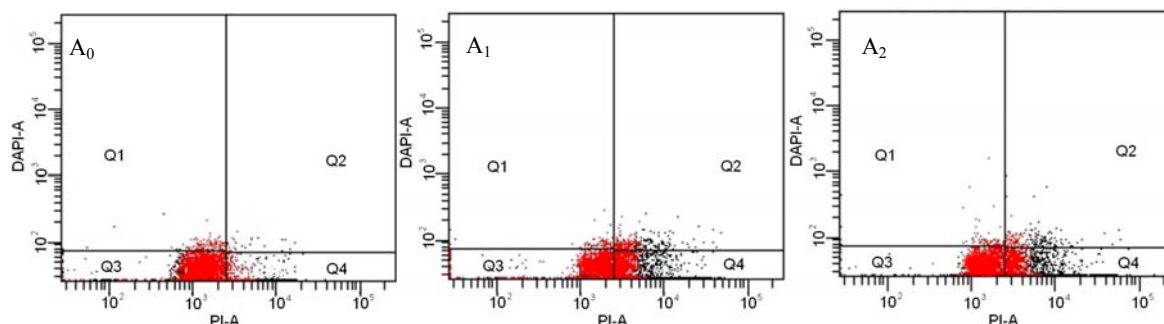
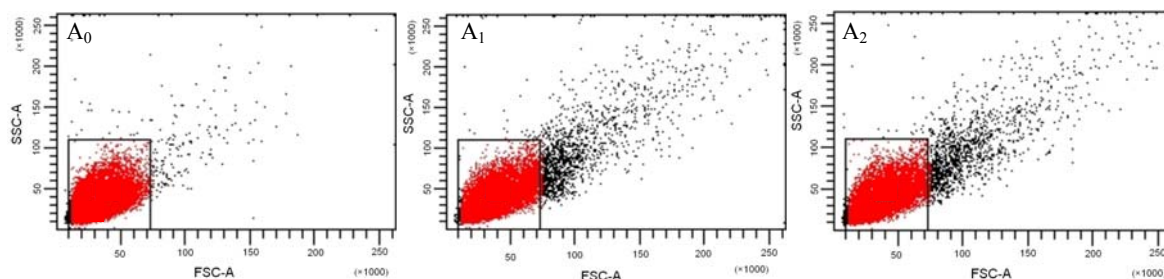


图 6 CTAB 投加 96 h 后 Hoechst-PI 双参数二维散点图
 Fig.6 Representative Hoechst-PI bivariate graphs in the presence of CTAB after 96 h

将所测量细胞以前向散射(FSC)对侧向散射(SSC)作二维点图(图 7),以空白对照的藻细胞(A_0)为分界,设定门,门内为正常生长细胞,门外则为

受损细胞。检测结果表明,随蛋白核小球藻受 CTAB 毒害,受损细胞数量增多。



横坐标示前向散射光相对强度,纵坐标示侧向散射光相对强度,均以“道数”计。

图 7 CTAB 投加 96 h 后 SSC-FSC 二维散点图

Fig.7 Representative FSC-SSC bivariate graphs in the presence of CTAB after 96 h

3 结论与讨论

蛋白核小球藻受 CTAB 的毒性效应明显,其藻细胞浓度、叶绿素 a 含量、水溶性蛋白质含量、SOD 活性以及 MDA 含量等 5 种指标变化与 CTAB 剂量呈现剂量—效应关系和时间—效应关系。电镜扫描观察及流式细胞仪分析均可证实 CTAB 可使藻细胞膜的结构遭到破坏,坏死细胞量增多。根据活性参数变化规律及流式细胞仪对藻细胞凋亡的测定结果,确定 CTAB 通过破坏细胞膜完整性,抑制 SOD 活性,导致 MDA 含量持续上升,导致膜脂质过氧化是 CTAB 对蛋白核小球藻致毒性的主要原因。

CTAB 对蛋白核小球藻的毒性主要是由于其分子的两极性,能与膜成分中的亲脂和亲水基团相互作用,易于吸附在藻细胞的磷脂双分子膜结构的表面,与生物膜结合并插入或透过膜,随剂量的进一步增加,造成膜蛋白和脂分离,从而引起膜结构的破坏和功能的丧失,并刺激细胞产生大量活性氧。电镜扫描图片显示藻细胞在 CTAB 作用下变形严重,正常生理功能被破坏;流式细胞仪测试结果也进一步证实在 CTAB 作用下,藻细胞出现大量坏死现象。

试验中观察到高剂量(0.24 mg/L)组 CTAB 作用 72 h 后,容器底部出现大量无色或白色藻细胞沉淀物,这是因为藻细胞膜破坏后,叶绿素大量游离,在酸性条件下叶绿素分子卟啉环中央的镁离子被 2 个氢离子置换转化成脱镁叶绿素(Pheo)^[16]而形成

的。脱镁叶绿素的大量产生,说明活性叶绿素含量降低,与叶绿素含量的测量数据相吻合。

在 CTAB 作用下,蛋白核小球藻细胞内蛋白质和叶绿素 a 含量变化呈现出一定的相关性,这是因为光合膜色素——蛋白质复合物能进行光能吸收、传递和转化^[17],对光合作用有重要影响。同时,蛋白质对维持光合器结构的稳定性和功能具有重要的作用^[18]。受高剂量 CTAB 毒害,蛋白核小球藻细胞蛋白质含量明显降低,而藻细胞结构的损伤将无法保证叶绿素功能的正常发挥,从而使光合作用无法正常进行,藻细胞生命代谢所需物质和能量无法保障,进而影响 SOD 活性以及 MDA 含量。

参考文献:

- [1] Zelimir P, Zeljka V C, Dinko P. Toxicity of surfactants to green microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Scenedesmus subspicatus* and to marine diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Skeletonema costatum*[J]. Chemosphere, 2005, 61(8): 1061–1068.
- [2] Dania B, Francesca P, Francesca M, et al. Comparison of cetylpyridinium chloride and cetyltrimethylammonium bromide extractive procedures for quantification and characterization of human urinary glycosaminoglycans[J]. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2010, 48(8): 1133–1139.
- [3] Partha M, Susanta K P, Sukalyan D, et al. Clouding behaviour in surfactant systems[J]. Advances in Colloid and Interface Science, 2011, 162(1/2): 59–79.

(下转第 68 页)