

# Cu( II )、Fe( III )和Cr( III )在弱酸性条件下 对大肠杆菌的毒性和致毒机制\*

徐芳芳<sup>1,2</sup> 黄满红<sup>1</sup> 陈 亮<sup>1\*\*</sup> 柿井一男<sup>2</sup>

(1. 东华大学环境科学与工程学院, 上海, 201620; 2. 日本宇都宫大学材料与环境化学系, 宇都宫, 321-0904)

**摘 要** 比较了弱酸性条件下 Cu( II )、Fe( III )和Cr( III )单独或加入抗坏血酸(L-AscA)对大肠杆菌(*E. coli*)的毒性,深入分析了 Cu( II )/L-AscA 体系的特性;通过电子自旋共振(ESR)定量分析羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ )浓度以分析其毒性机理. 结果表明, pH 4.0 下 L-AscA 促进了 Cu( II )、Fe( III )而非Cr( III )的毒性,三者毒性 Cu( II ) > Cr( III ) > Fe( III ). 通常被认为无毒的Cr( III )却在 0.2 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 4.0 时表现出了很高的杀菌率. 与 0.01% L-AscA 共存时,Cu( II )为 200、20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 2、0.2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 下,*E. coli* 的存活率分别在30 min 和 2 h 内迅速降至零,且该体系对自然水体中分离所得的其它 7 种菌株同样具有明显的抑制作用. ESR 结果表明 L-AscA 的加入使 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cu( II )反应体系的  $\cdot\text{OH}$ 浓度约提高两倍, $\cdot\text{OH}$ 浓度呈 Cu( II )浓度依赖.但在 Fe( III )、Cr( III )/L-AscA 体系中未检测到  $\cdot\text{OH}$ ,表明三者对细胞的致毒机制存在明显差异.

**关键词** 过渡金属, 抗坏血酸, 毒性, ESR.

随着人类对健康和安全的认识愈加重视,金属毒理学在环境领域中的应用研究已愈加凸显. 金属对细胞的作用具有双重性<sup>[1-2]</sup>:一方面一些金属(铁、铜、锌、三价铬等)能够为细胞提供维持正常生理平衡的必需元素;另一方面它们能催化一些反应使细胞致毒,过度暴露可能导致人类多种疾病发生,因此了解其作用机制有助于更有效地预防和治疗. 关于铁的研究已相对成熟,二价铁几乎为所有生物的必需元素,其在细胞体内广泛存在. 当前研究已表明,细胞内铁的毒性主要是由于它能与细胞体内的过氧化氢发生 Fenton 反应并生成  $\cdot\text{OH}$ ,从而破坏 DNA、脂类等,使细胞产生基因突变甚至死亡<sup>[1, 3-4]</sup>. 铜与铁类似,也为细胞体内必需的微量元素之一,在细胞体内作为多种酶的辅因子辅助电子传递,且同样可以与过氧化氢发生反应,因此其可能具有与铁类似的毒性机理<sup>[1, 5]</sup>. 铬通常以Cr( III )和Cr( VI )两种形态存在,Cr( VI )对人类和动物具有很高的毒性及致癌性,但Cr( III )通常被认为是无毒的,且可用于补充微量营养元素. 而 Ozawa 等<sup>[6]</sup>指出Cr( III )能与生物还原剂(如 L-半胱氨酸以及 NADH)发生 Haber-Weiss 反应并生成 Cr( II ). L-抗坏血酸(L-AscA)又称维他命 C 被广泛应用于日常生活中,如食品、饮料中的抗氧化剂,但在特定条件下又能作为促氧化剂,通过其还原性能引发并促进 Fenton 反应的发生<sup>[7]</sup>,L-AscA 的加入能快速将 Cu( II )或Fe( III )还原为低价态的 Cu(I)或 Fe( II ),在氧气存在条件下,两者继而催化 Fenton 反应并产生活性氧化物质,从而增强金属的毒性<sup>[8]</sup>.

本研究比较了低 pH 体系下 Cu( II )、Fe( III )和Cr( III )单独以及与 L-AscA 共存对大肠杆菌(*E. coli*)的毒性及 L-AscA 被氧化速率的影响,对细胞死亡速率较高的 Cu( II )/L-AscA 体系展开了进一步分析. 并考虑其应用前景,从天然水体中分离出相应菌株,初步探讨了所分离各菌株对该体系的敏感度. 同时,通过电子自旋共振技术(ESR; electron spin resonance)检测各反应体系产生的羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ ),对该体系致毒或杀菌的机理进行了探索,为进一步研究金属离子的杀菌机理提供了理论依据.

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 仪器、试剂与培养基

101 型紫外分光光度计、FE-SEM S-4500 扫描电子显微镜、HCP-2 临界点干燥装置(日立);BS-305

2012 年 2 月 29 日收稿.

\* 国家自然科学基金(21007010);教育部博士点基金项目(20090075120007);上海科委项目(09230500200);交通运输部科技项目(2010353343290);湖南省科技厅科研项目(200908)资助.

\*\* 通讯联系人, Tel: 86-21-67792546; E-mail: demixu@mail.dhu.edu.cn

高压灭菌锅(日本 TOMY SEIKO);K020A047A 膜过滤器(ADVANTEC);model JES-TE100 电子自旋共振波谱仪;ESP-300E 电子自旋顺磁共振仪(瑞士布鲁克)。

所用菌株为 *Escherichia coli* IAM12119, 购买自东京大学分子细胞生命科学研究院. 其它相关菌株由日本宇都宫大学柿井实验室分离并进行 16rRNA 基因同源性测定(分离自该大学 France 庭园水池). 蛋白胨购买自日本制药. 酵母粉和琼脂来自英国 Oxoid 公司. 肉汤购自京都制药. 抗坏血酸、五水硫酸铜( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )和硫酸铁( $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ )、磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )均购买自关东化学(特级). 硫酸铬( $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ )来自日本和光纯药. 3,3,5,5-四甲基-1-吡咯啉-N-氧化物(M4PO/TMPO)和 4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶 1-氧基苯甲酸盐自由基(TEMPOL) 购买自 LABTOEC.

1 L 聚蛋白胨液体培养基包含蛋白胨 10 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0 g、 $\text{NaNO}_3$  500 mg、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  200 mg、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  50 mg、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  10 mg、 $\text{NaCl}$  100 mg、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0 mg 以及重蒸水 1000 mL. 各琼脂培养基的组分如表 1 所示.

表 1 各琼脂培养基组分表

Table 1 Composition of agar media used

B-1 琼脂培养基(B-1)		NY 斜面培养基(NY)		Sakurai 琼脂培养基	
蛋白胨	5.0 g	蛋白胨	5.0 g	蛋白胨	2.0 g
NaCl	5.0 g	酵母	5.0 g	酵母	5.0 g
肉汤	3.0 g	肉汤	3.0 g	葡萄糖	3.0 g
琼脂	15.0 g	琼脂	15.0 g	琼脂	15.0 g
重蒸水	1000 mL pH 7.0	重蒸水	1000 mL pH 7.0	重蒸水	1000 mL pH 7.0

## 1.2 实验方法

为保证实验结果的重现性,以下结果都进行了 3 次或 3 次以上重复.

### 1.2.1 细菌的培养

将 *E. coli* 在 NY 中 36 °C 培养 24 h 后,取一白金耳量分散到 10 mL 的灭菌蒸馏水中,加入到 250 mL 聚蛋白胨液体培养基中,25 °C 恒温水浴 14 h(稳定期)隔夜培养至细胞的稳定期后,高速离心集菌( $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  10 min). 用  $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的磷酸氢钠缓冲液(pH 7.0)洗涤并离心 2 次,用相同缓冲液重悬浮细胞并调节吸光度至 OD660 0.35(约  $10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). 将所得菌液用相同的磷酸氢钠缓冲液进行 10 倍系列稀释至  $2 \times 10^4 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$  后进行后续实验.

### 1.2.2 细菌存活率分析

各反应体系对 *E. coli* 的毒性通过比较细菌的存活率来确定. 存活率以各试剂加入前的菌落数为基准,将试剂加入后的菌落数与之比较计算而得. 各试剂加入到  $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的磷酸氢钠缓冲液(pH 7.0)中顺序为:*E. coli* 菌液、新鲜制备的 L-AscA 溶液、 $\text{CuSO}_4$  /  $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$  /  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  溶液(灭菌). 其中 L-AscA 和金属溶液按照不同实验要求分别单独或共同加入到菌液中. L-AscA 的最终浓度根据不同实验要求分别调整至 0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1% (W/V);  $\text{CuSO}_4$  /  $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$  /  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  的最终浓度为 200、20、2、0.2  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 菌液最终浓度为  $10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ . 将混合液置于 25 °C 恒温水浴培养,并用磁力搅拌子以  $300 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  速度匀速搅拌. 分别在 0、0.5、1、2、3、4、8 以及 24 h 取 100  $\mu\text{L}$  反应液(混合液中菌体浓度高于  $10^3 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,则额外稀释至最终平板浓度接近  $10^2 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 加入到 37 °C B-1 中平板培养. 待培养基固化后放入 36 °C 恒温箱培养 48 h 后进行菌落计数并计算存活率. 另外,在 0 和 24 h 时分别测反应液的 pH 值.

### 1.2.3 细菌死亡速率常数计算

L-AscA 与 Cu(II) 杀菌体系中死亡速率常数通过生菌数减少的一阶方程计算而得. 将  $dN/dt = -kN$  式进行变形再积分得到  $\ln N = -kt + \ln N_0$  其中  $\ln N$  对时间  $t$  所作图中曲线的斜率即为细菌死亡的速率常数  $k(\text{h}^{-1})$ ,  $N$  为生菌数( $\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),  $t$  为接触时间(h).

### 1.2.4 L-AscA 降解速率分析

L-AscA 降解速率分析时,各反应试剂的加入顺序与杀菌实验中完全相同. 分别在 0、0.5、1、2、3、4、

6、8、16、24 h 取 1 mL,在波长 245 nm 下用紫外分光光度计测定 L-AscA 吸收值。

### 1.2.5 ESR 测定羟基自由基浓度

本研究中采用电子自旋共振(ESR)技术来检测反应系统中生成的羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ )浓度.实验参数设定:温度 25.0  $^{\circ}\text{C}$ ,基准频率 9.42 GHz,微波功率 8.00 mW,扫描区域(335.200  $\pm$  5) mT,扫描时间 2 min,时间常数 0.1 s,调制频率 100 kHz,场调制强度 0.2 mT,放大倍数 500.

实验时,以 M4PO 作为捕捉剂,用  $10^{-6}$   $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  TEMPOL 标准液作为  $\cdot\text{OH}$  浓度计算时的参照标准.各反应物(单独或共同作用下)的添加顺序为:0.1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  M4PO、0.3  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸氢钠缓冲液、L-AscA 以及  $\text{CuSO}_4$  (或  $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$  或  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ),最后加入 1000 倍稀释后的浓硫酸调节 pH 值约为 4.0.根据不同的分析条件,分别调节各个组分到既定的不同浓度.为使生成的  $\cdot\text{OH}$  能立即被捕捉并检测到,M4PO 必须首先加入.0.1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  M4PO 加入量为 140  $\mu\text{L}$ ,其它反应物的量分别按照预定的最终浓度计算后加入.反应液加入完毕后,涡旋混合 10 s 后加入到 25  $^{\circ}\text{C}$  恒温水槽中培养(以确保反应条件与杀菌实验过程中相同),反应 2 min 后取 180  $\mu\text{L}$  反应液,转移至平板石英玻璃管并放入谐振腔中开始测量.

$\cdot\text{OH}$  浓度根据 ESR 谱图进行计算.M4PO-OH 加合物浓度通过对 ESR 图谱中每个波峰的二次积分计算而得.1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  TEMPOL 溶液被用作标准溶液计算样品中的羟基自由基的浓度. TEMPOL-OH 加合物的浓度也同样通过对每个波峰的二次积分计算而得.所有实验样品以及标准溶液测试过程中的参数设定都保持一致而且被同时跟踪并记录.

## 2 结果与讨论

### 2.1 Cu(II)、Fe(III)、Cr(III) 及其与 L-AscA 共存体系对 *E. coli* 作用的比较

图 1A、B 分别为各金属单独作用与与 L-AscA 联合作用下对大肠杆菌存活率的影响.从图 1A 可以看出,各金属单独存在时,浓度为  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH 值约 4.0 条件下,Fe(III) 对 *E. coli* 的抑制能力明显弱于 Cu(II) 和 Cr(III).通常被认为无毒的 Cr(III) 在该实验条件下,却在 0.5 h 内使 *E. coli* 全部死亡.相同时间下,在各金属中加入 0.01% L-AscA 后 *E. coli* 的死亡率增大(图 1B).0.01% L-AscA 与  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cu(II) 共存时,30 min 内细胞全部死亡(Cu(II) 单独存在时需 2 h);与  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Fe(III) 共存时 *E. coli* 的死亡速率也明显加快(1 h 后,*E. coli* 的存活率降低了 50%);但与  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cr(III) 共存时杀菌率没有明显变化.

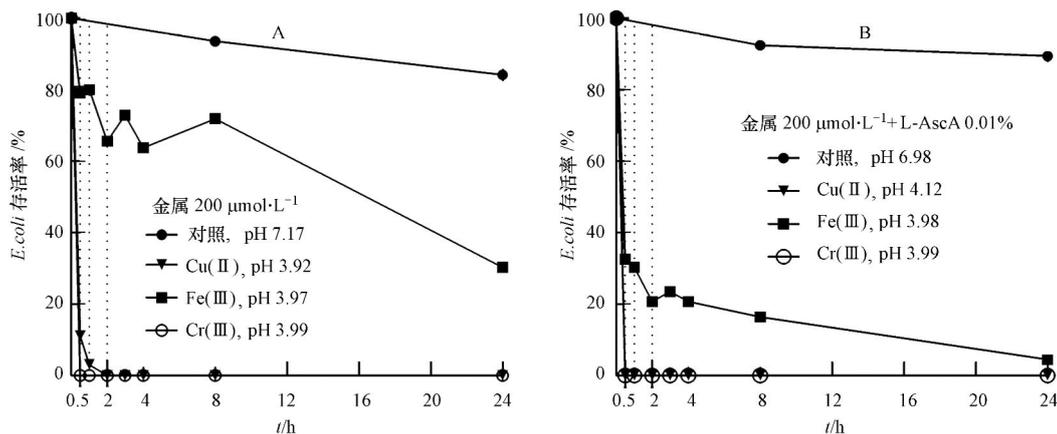


图 1  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cu(II)、Cr(III) 或 Fe(III) 作用下 *E. coli* 的存活率比较

A. 金属单独作用;B. 金属与 0.01% L-AscA 共存;图中 pH 为反应初始值

Fig. 1 *E. coli* cell viability after exposure to  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cu(II), Cr(III) or Fe(III)

### 2.2 L-AscA 被氧化速率分析

L-AscA 存在下各金属使 *E. coli* 致死速度的差异可能与它们氧化 L-AscA 能力的不同直接相关,L-AscA 浓度下降越快,表明系统产生  $\cdot\text{OH}$  和 Cu(I) 也越快.本文比较了各反应体系中 L-AscA 浓度下降的趋势,其结果与同等条件下细菌存活率分析的结果相一致(图 2).Cu(II) 和 Fe(III) 加入后 L-AscA 的

降解速度明显加快,  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cu(II) 下 L-AscA 的降解速度最快, 1 h 内便降至零,  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cu(II) 存在时次之, L-AscA 在 4 h 后完全降至零. 但 Cr(III) 加入后, L-AscA 的降解速度反而变慢了. 进一步证明了 Cr(III) 与前两种金属对细菌的作用存在明显的差异.

### 2.3 Cu(II)/L-AscA 体系对 *E. coli* 的致死率分析

Cu(II)/L-AscA 共存对 *E. coli* 的毒性显然强于其它两个反应体系, L-AscA 的降解速度也明显更快, 以下针对该体系展开进一步讨论.

#### 2.3.1 Cu(II)、L-AscA 单独作用

将不同浓度的 Cu(II) 分别加入到  $10^6 \text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 *E. coli* 菌液中, pH 调节至 4. 不同时间点下细胞的存活率如图 3 所示. 细菌的存活率呈 Cu(II) 浓度依赖,  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度下, 2 h 后细菌存活率降至零, 在  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $0.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度下接触 24 h 后, *E. coli* 的存活率分别降至初始时的约 10%、50% 和 75%.

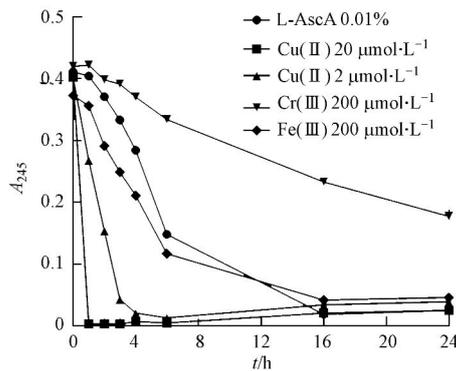


图 2 Cu(II)、Fe(III)、Cr(III) 存在条件下 L-AscA 降解速度分析

Fig. 2 L-AscA degradation rate after incubating with Cu(II), Cr(III) and Fe(III)

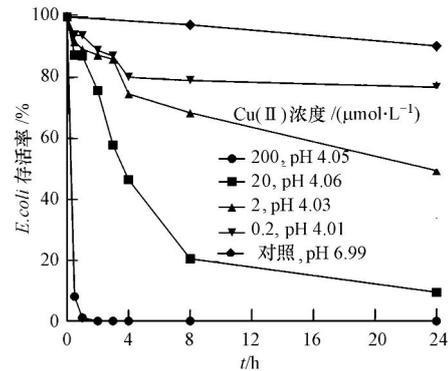


图 3 Cu(II) 单独作用下 *E. coli* 的存活率测定

Fig. 3 *E. coli* viability after exposure to Cu(II) alone

相同条件下的菌液暴露于不同浓度的 L-AscA 中(由于随着加入的 L-AscA 量的增加, 溶液的 pH 降低, 因此在 L-AscA 浓度变化的相关实验中, 都通过稀硫酸调节 pH 至 4.0), 随着 L-AscA 浓度的增加, *E. coli* 的存活率下降, 但当浓度超过 0.01% 后, 再增大其浓度则细菌死亡率无明显变化(图 4). 0.1%、0.05% 和 0.01% L-AscA 作用 24 h 后, *E. coli* 的存活率降至零, 而 0.005% 和 0.001% 作用下大约降至初始值的 40%. 尽管其杀菌机制仍然存在争议, 但 L-AscA 高于一定浓度后, 能够作为氧化促进剂, 而且已经有诸多报导指出 L-AscA 能够导致细胞内  $\text{H}_2\text{O}_2$  的产生<sup>[9-12]</sup>, 并可能导致细胞的死亡.

#### 2.3.2 Cu(II) 和 L-AscA 单独与共同作用比较

将 0.01% L-AscA 加入到  $0.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cu(II) 中后, *E. coli* 的死亡速度大大增加(图 5). 1 h 后细胞的存活率从 Cu(II) 单独存在时的 86% 和 0.01% L-AscA 单独存在时的 77% 降至了共存时的 39%, 与之对应的 0—1 h 内 *E. coli* 死亡速度常数分别从  $0.03 \text{h}^{-1}$  和  $0.21 \text{h}^{-1}$  升至共存时的  $1.08 \text{h}^{-1}$ . 2 h 后存活率迅速降至零( $0.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cu(II) 单独存在时高达 80%). 表明 Cu(II) 和 L-AscA 共存时 *E. coli* 的死亡速度远大于两者单独存在时细胞的死亡速度之和, 因而在杀菌时存在明显的协同作用.

#### 2.3.3 Cu(II)、L-AscA 浓度变化的影响

在 0.01% L-AscA 与不同浓度 Cu(II) 共存下 *E. coli* 的存活率分析如图 6A. *E. coli* 死亡速率表现出了 Cu(II) 浓度依赖. 该体系下  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cu(II) 能在 30 min 内使 *E. coli* 全部死亡,  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cu(II) 在 2 h 内使细胞存活率降至零.

传统 Fenton 试剂已被广泛用于处理水体中的各种有机污染物如酚类、甲醛、苯、杀虫剂等、降低污水中 BOD/COD 以及杀菌等领域<sup>[13-15]</sup>. 但由于 Fe(II) 的循环利用能力差, 需要提供较多的 Fe(II) 而使成本增加. 但 Cu(II) 催化的该反应体系下, 不仅杀菌能力更强, 所需 Cu(II) 浓度也相对更低, 且可以在

L-AscA 充足的情况下被不断循环利用. 0.01% L-AscA 下,  $0.2\text{--}20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cu(II) 范围内, *E. coli* 都具有非常高的死亡速率. 我国饮用水水质标准中 Cu(II) 限制浓度为  $1.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $\approx 16\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). 因此与传统 Fenton 试剂相比 Cu(II) 和 L-AscA 共存体系具备更多优势, 具有广泛的应用前景.

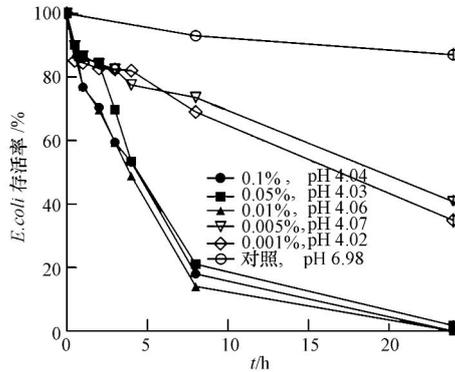


图4 L-AscA 单独作用下 *E. coli* 存活率测定

Fig. 4 *E. coli* viability after exposure to L-AscA alone

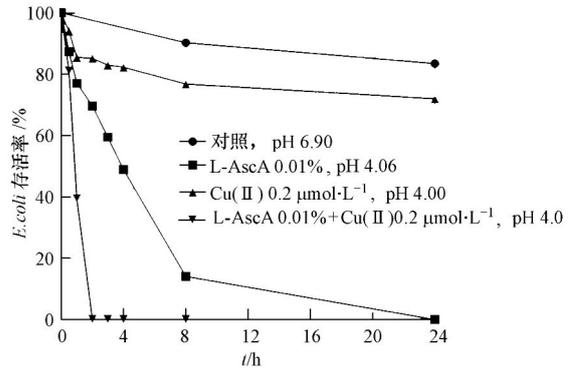


图5 Cu(II) 和 L-AscA 单独与共同作用下的 *E. coli* 存活率比较

Fig. 5 *E. coli* viability after exposure to Cu(II) and L-AscA independently and cooperatively

图6B 为不同 L-AscA 浓度和恒定  $0.2\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cu(II) 下该体系的灭菌能力比较. L-AscA 浓度为 0.1%、0.05%、0.01%、0.005% 时, 2 h 后细胞全部死亡, 0.001% 时, 大约 8 h 后, 细胞存活率降至零. 比较 0.5、1 h 时各存活率可知, 杀菌效果随着 L-AscA 浓度的增加而略显增强, 但变化幅度不大. 浓度高于 0.01% 后, 细菌的死亡速率增大幅度较小. 比较以上结果表明该杀菌系统对 Cu(II) 浓度变化的依赖性高于 L-AscA 浓度的变化. 因此推测本反应系统下 Cu(II) 在细胞死亡的过程发挥着首要作用.

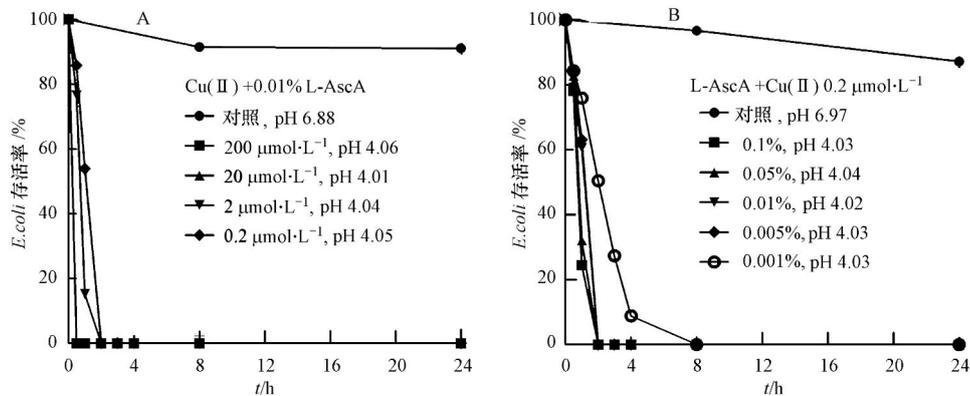


图6 Cu(II)/L-AscA 共存下 *E. coli* 存活率分析

A. Cu(II) 浓度的影响; B. L-AscA 浓度的影响

Fig. 6 *E. coli* viability after exposure to Cu(II)/L-AscA co-system

#### 2.3.4 Cu(II)/L-AscA 共存对其它分离出的菌株的作用

16rRNA 基因同源性测定的菌株类别测定结果以及杀菌实验中所使用的菌体的培养时间及菌体浓度如表 2. 鉴定各菌株依次为: F-4 缺陷短波单胞菌 (*Brevundimonas diminuta*)、F-10 气单包细菌 (*Aeromonas culicicola*)、F-15 慢性型根瘤菌 (*Bosea massiliensis*)、F-16 申式不动杆菌 (*Acinetobacter schindleri*)、F-18 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、F-21 tropica 伯克菌属 (*Burkholderia tropica*)、F-25 草螺旋菌 (*Herbaspirillum huttiense*)。

0.01% L-AscA 与  $0.2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cu(II) 共同作用下对 F-4、F-10、F-15、F-16、F-18、F-21、F-25 菌株的杀菌效果明显强于 0.01% L-AscA 单独存在时(表 3). 两者共存体系下, 所测菌株的存活率都在 24 h 内减至零, 且 F-4、F-10、F-15、F-16 及 F-25 菌株都在 30 min 内全部死亡(对比于 0.01% L-AscA 单独存

在时分别为 1、4、4、4、24 h)。不同菌株对外界刺激的感受能力不同,其抵御机制也不同,但在Cu( II )/L-AscA共同作用下都表现出了低存活率。

表 2 France 庭园池水中分离菌株的种属类别确定、培养时间及菌体浓度

Table 2 Identification of strains isolated from France ponds, cell culture time and cell density

菌株序号	最接近菌属名	相同率 /% *	培养时间/h **	OD <sub>660</sub> = 0.35 时菌体浓度 /(CFU·mL <sup>-1</sup> )
F-4	<i>Brevundimonas diminuta</i> IAM12691	98.3	72	约 5.0 × 10 <sup>8</sup>
F-5	<i>Brevundimonas diminuta</i> IAM12691	98.3	72	约 5.0 × 10 <sup>8</sup>
F-6	<i>Brevundimonas diminuta</i> IAM12691	98.3	72	约 5.0 × 10 <sup>8</sup>
F-10	<i>Aeromonas culicicola</i> MTCC3249	99.8	24	约 1.0 × 10 <sup>9</sup>
F-11	<i>Bosea massiliensis</i> 62387	99.1	48	约 1.0 × 10 <sup>9</sup>
F-13	<i>Aeromonas culicicola</i> MTCC3249	100	24	约 1.0 × 10 <sup>9</sup>
F-14	<i>Bosea massiliensis</i> 62387	99.1	48	约 1.0 × 10 <sup>9</sup>
F-15	<i>Bosea massiliensis</i> 62387	99.1	48	约 1.0 × 10 <sup>9</sup>
F-16	<i>Acinetobacter schindleri</i> LUH5832	97.6	24	约 8.0 × 10 <sup>8</sup>
F-18	<i>Bacillus subtilis</i> IAM12118	99.8	48	约 5.0 × 10 <sup>7</sup>
F-20	<i>Burkholderia tropica</i> Ppe8	99.8	84	约 6.0 × 10 <sup>8</sup>
F-21	<i>Burkholderia tropica</i> Ppe8	99.8	84	约 6.0 × 10 <sup>8</sup>
F-22	<i>Burkholderia tropica</i> Ppe8	99.8	84	约 6.0 × 10 <sup>8</sup>
F-24	<i>Bosea massiliensis</i> 62387	99.1	48	约 1.0 × 10 <sup>9</sup>
F-25	<i>Herbaspirillum huttiense</i> ATCC14670	99.8	36	约 1.0 × 10 <sup>9</sup>

注:培养基:Sakurai 琼脂培养基; \* 16rRNA 部分基因碱基序列的相同; \*\* 聚蛋白胨液体培养基中培养时间。

表 3 France 庭园池水分离菌株的杀菌结果(F 株)

Table 3 Cell killing of strains isolated from France ponds water (F-strain)

菌株序号	菌株名称	空白对照	L-AscA 0.01% pH 4.03	Cu( II ) 0.2 mmol·L <sup>-1</sup> + L-AscA 0.01% pH 4.03
F-4	<i>Brevundimonas diminuta</i>	24 h 后减少 50%	1 h 后存活率为 0	30 min 后存活率为 0
F-10	<i>Aeromonas culicicola</i>	24 h 后减少 10%	4 h 后存活率为 0	30 min 后存活率为 0
F-15	<i>Bosea massiliensis</i>	24 h 后增加 1.5 倍	4 h 后存活率为 0	30 min 后存活率为 0
F-16	<i>Acinetobacter schindleri</i>	24 h 后减少 40%	4 h 后存活率为 0	30 min 后存活率为 0
F-18	<i>Bacillus subtilis</i>	24 h 后减少 15%	24 h 后存活率为 0	24 h 后存活率为 0
F-21	<i>Burkholderia tropica</i>	24 h 后增长 3 倍	24 h 后存活率为 20%	4 h 后存活率为 0
F-25	<i>Herbaspirillum huttiense</i>	24 h 后增长约 25 倍	24 h 后存活率为 0	30 min 后存活率为 0

注:初期菌体浓度为 10<sup>3</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>。

## 2.4 ESR 测定 ·OH 及杀菌机理

杀菌结果表明,低 pH 下 L-AscA 促进了 Cu( II )、Fe( III )的杀菌能力,且 Cu( II )强于 Fe( III )。关于 *E. coli* 的死亡机制,一种可能是 Cu( II )与 L-AscA 共存下产生的 ·OH 浓度高于相同情况下 Fe( III )。另一种可能是此反应过程中生成的 Cu(I) 破坏细胞的正常功能,而导致细胞死亡<sup>[16]</sup>。但 Cr( III )表现出了不同的致毒机制。本研究采用 ESR 技术检测各条件下 ·OH 浓度,以验证第一种推测。

0.2 mmol·L<sup>-1</sup> Cu( II )单独存在时,系统检测到了约 0.86 μmol·L<sup>-1</sup>的 ·OH,加入 0.01% L-AscA 后 ·OH 浓度升高至约 1.73 μmol·L<sup>-1</sup>,约为前者的两倍(图 7)。表明 L-AscA 促进 Cu( II )的还原从而产生更高浓度的 ·OH。而且 10<sup>6</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>和 10<sup>9</sup> CFU·mL<sup>-1</sup> *E. coli* 存在时,也得到了类似的结果。·OH 浓度表现出了 Cu( II )浓度依赖(图 8),随 Cu( II )浓度的降低而降低。L-AscA 为 0.01%,Cu( II )分别为 0.2、0.15、0.1 mmol·L<sup>-1</sup>时,·OH 浓度分别约为 1.85、1.67、1.33 μmol·L<sup>-1</sup>。即当 Cu( II )/L-AscA 质量浓度比例 ≥ 0.064 时,L-AscA 加入均能促进反应体系产生 ·OH。但是再降低 Cu( II )浓度至 0.02 mmol·L<sup>-1</sup>后,在该实验条件下 ESR 未检测到 ·OH,即 Cu( II )/L-AscA 比例降至 0.0128 后,L-AscA 反而降低了体系产生的 ·OH 浓度。以上结果与 *E. coli* 死亡速率表现出一致性。因此推测 ·OH 是促进细

胞死亡的原因之一. L-AscA 既能作为  $\cdot\text{OH}$  生成的促进剂又能作为清除剂, 当 L-AscA 对  $\text{Cu}(\text{II})$  的相对浓度升高时, 低浓度  $\text{Cu}(\text{II})$  下产生的有限  $\cdot\text{OH}$  浓度在被 M4PO 捕捉之前可能已被 L-AscA 消除.

$\text{Fe}(\text{III})$  单独存在时, ESR 检测到了相对较小浓度的  $\cdot\text{OH}$  (图 7). 但与  $\text{Cu}(\text{II})$  反应系统相反, 加入 0.01% L-AscA 后, 所测得  $\cdot\text{OH}$  浓度反而减小了, 这可能是产生的有限的  $\cdot\text{OH}$  被 L-AscA 所清除.  $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Cr}(\text{III})$  单独存在时表现出了高杀菌率, 但是在本研究的实验条件下未检测到  $\cdot\text{OH}$ .

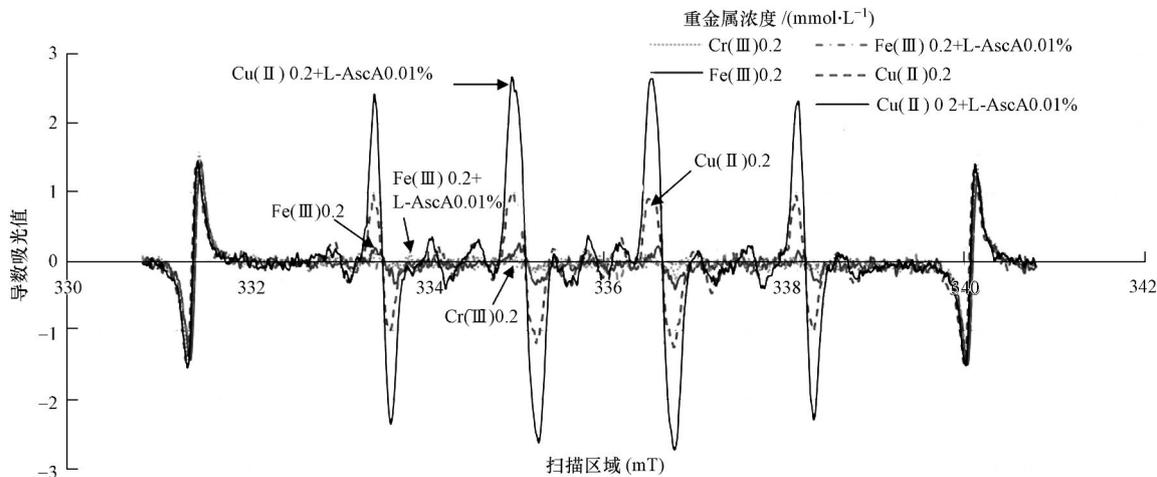


图 7 不同条件下  $\cdot\text{OH}$  的 ESR 谱图

Fig. 7 ESR spectra of hydroxyl radicals detected under different conditions

总之, ESR 结果表明了 L-AscA 的加入明显增加了  $\text{Cu}(\text{II})$  体系中  $\cdot\text{OH}$  浓度, 但对  $\text{Fe}(\text{III})$  和  $\text{Cr}(\text{III})$  体系则无明显影响.  $\text{Cu}(\text{II})$  体系中,  $\cdot\text{OH}$  浓度越高 *E. coli* 的死亡速率也相应的更高.  $\text{Cr}(\text{III})$  的杀菌机制相对复杂有待进一步研究.

$\cdot\text{OH}$  对细胞的破坏机制已被广泛研究, 对真核细胞的研究指出它能破坏细胞的 DNA<sup>[17-20]</sup>, 导致脂质的过氧化反应<sup>[1]</sup>, 攻击细胞膜上的脂质并导致一系列自由基链式反应从而严重破坏细胞膜, 使蛋白质变性失活等<sup>[21]</sup>. 但是由于  $\cdot\text{OH}$  极强的氧化性 (反应速度常数约为  $10^{10} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ), 极短的寿命 ( $10^{-6}$ — $10^{-3}$  s) 导致它不能穿透细胞膜而进入细胞, 使其对细胞造成破坏. 值得注意的是  $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Cu}(\text{II})$  单独存在时, 系统检测到了一定量的  $\cdot\text{OH}$  (图 7), 但对应该条件下系统的杀菌能力 (图 5) 却弱于未检测到  $\cdot\text{OH}$  的  $0.02 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Cu}(\text{II})$  和 0.01% L-AscA 共存系统 (图 6A 和图 8), 表明除  $\cdot\text{OH}$  外, 铜离子尤其是单价铜本身也可能对细胞存在破坏作用, 该推测与 Macomber 等的结果一致<sup>[16]</sup>. 因此除了  $\cdot\text{OH}$  外, 还需考虑 Cu 本身对细胞的作用和毒性. 综合以上讨论, 对有氧条件下  $\text{Cu}(\text{II})$ /L-AscA 体系对 *E. coli* 的致死机制进行一个简单的归纳如图 9.

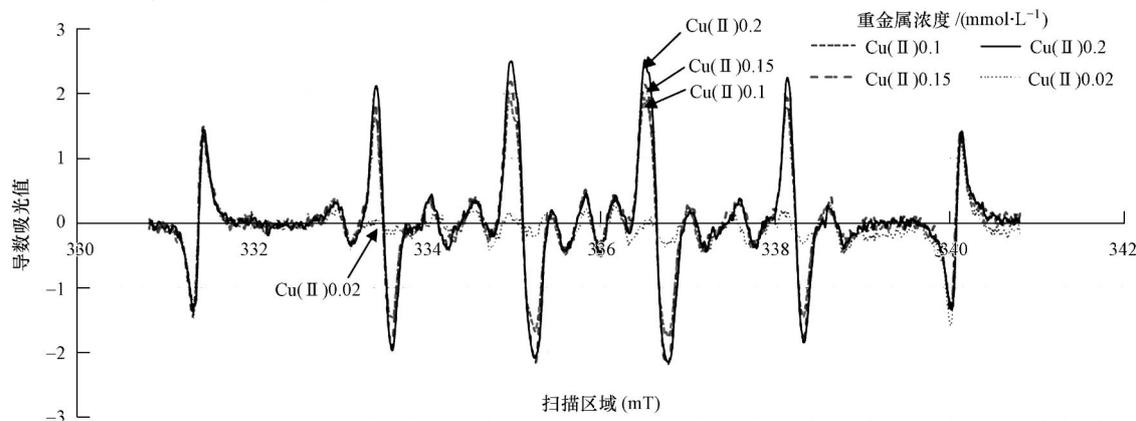


图 8 0.01% L-AscA + 不同  $\text{Cu}(\text{II})$  浓度下检测到的  $\cdot\text{OH}$  ESR 谱图

Fig. 8 ESR spectra of hydroxyl radicals produced by 0.01% L-AscA + varied concentrations of  $\text{Cu}(\text{II})$

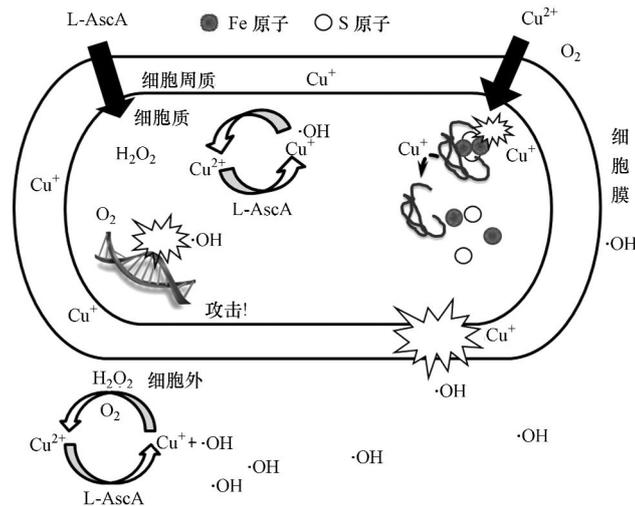


图9 Cu(II) + L-AscA 反应体系对 *E. coli* 的杀菌机理示意图

Fig.9 Cu(II) and L-AscA cell killing mechanism

### 3 结论

好氧条件下 L-AscA 的加入明显增强了 Cu(II) 和 Fe(III) 对 *E. coli* 的毒性,但没有影响 Cr(III) 的毒性. 其中 Cu(II) 和 L-AscA 共存时表现出最明显的正协同作用. Cu(II) 浓度越高 *E. coli* 死亡速率越大,且该体系对自然水体中分离出的其它菌体同样具有很强杀菌作用. 低于环境水质标准的 Cu(II) 便能有效杀菌,低浓度的 Cu(II) 和 L-AscA 都是环境友好的试剂,因此在新型环保杀菌或降解污水中的有机污染物等方面具备广泛应用前景.

ESR 确认了 Cu(II)/L-AscA 共存的体系中产生大量  $\cdot\text{OH}$ , 且与 *E. coli* 的死亡存在关联性,但目前的技术尚不能确定  $\cdot\text{OH}$  所破坏的细胞的具体部位. 杀菌能力相对较弱的 Fe(III)/L-AscA 体系未检测到  $\cdot\text{OH}$ , 0.2 mmol·L<sup>-1</sup> Cr(III) 单独存在时也未检测到  $\cdot\text{OH}$ , 其毒性机理相对复杂,需要进一步研究. 该反应体系在 pH 4.0 下进行,在该 pH 下大约有一半的 L-AscA 以未解离的状态存在,因而能够穿过细胞膜,继而促进细胞体内含有的 Cu(II)、Fe(III) 等的还原,并生成 Cu(I)、Fe(II) 等,同样在细胞体内能产生破坏作用.

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Valko M, Morris H, Cronin M T. Metals, toxicity and oxidative stress[J]. *Curr Med Chem*, 2005, 12(10): 1161-1208
- [ 2 ] Finney L A, O'Halloran T V. Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors[J]. *Science*, 2003, 300(5621): 931-936
- [ 3 ] Peebles B, Nagy A, Waldman W J, et al. Fenton activity and cytotoxicity studies of iron-loaded carbon particles[J]. *Environ Sci Technol*, 2010, 44(17): 6887-6892
- [ 4 ] 戴乾圆, 居遼. 羟基自由基与 DNA 中腺嘌呤碱基间反应的 AM1 研究[J]. *环境化学*, 2010, 29(6): 529-536
- [ 5 ] Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease[J]. *Toxicology*, 2011, 283(2/3): 65-87
- [ 6 ] Ozawa T, Hanaki A. Spin-trapping studies on the reactions of Cr(III) with hydrogen peroxide in the presence of biological reductants: is Cr(III) non-toxic? [J]. *Biochem Int*, 1990, 22(2): 343-352
- [ 7 ] Dehghan M, Akhtar-Danesh N, McMillan C R, et al. Is plasma vitamin C an appropriate biomarker of vitamin C intake? A systematic review and meta-analysis[J]. *Nutr J*, 2007, 6: 41-53
- [ 8 ] Cross J B, Currier R P, Torraco D J, et al. Killing of bacillus spores by aqueous dissolved oxygen, ascorbic acid, and copper ions[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(4): 2245-2252
- [ 9 ] Takemura, Y, Satoh M, Satoh K, et al. High dose of ascorbic acid induces cell death in mesothelioma cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 394(2): 249-253
- [ 10 ] Chen Q, Espey M G, Sun A Y, et al. Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid *in vivo*[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(21): 8749-8754

- [11] Clement M V, Ramalingam J, Long L H, et al. The *in vitro* cytotoxicity of ascorbate depends on the culture medium used to perform the assay and involves hydrogen peroxide[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2001, 3(1): 157-163
- [12] Arakawa N, Nemoto S, Suzuki E, et al. Role of hydrogen peroxide in the inhibitory effect of ascorbate on cell growth[J]. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 1994, 40(3): 219-227
- [13] Wang M, Yang G, Feng H, et al. Optimization of Fenton process for decoloration and COD removal in tobacco wastewater and toxicological evaluation of the effluent[J]. *Water Sci Technol*, 2011, 63(11): 2471-2477
- [14] Klamerth N, Malato S, Agüera A, et al. Treatment of municipal wastewater treatment plant effluents with modified photo-fenton as a tertiary treatment for the degradation of micro pollutants and disinfection[J]. *Environ Sci Technol*, 2012, 46(5): 2885-2892
- [15] 邹彩琼, 邓安平, 赵小蓉, 等. 铁锰矿类 Fenton 异相光催化降解有毒有机染料[J]. *环境化学*, 2010, 29(6): 1032-1037
- [16] Macomber L, Inlay J A. The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(20): 8344-8349
- [17] Arciello M, Rotilio G, Rossi L. Copper-dependent toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells involves mitochondrial damage[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 327(2): 454-459
- [18] Krumschnabel G, Manz C, Berger C, et al. Oxidative stress, mitochondrial permeability transition, and cell death in Cu-exposed trout hepatocytes[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, 209(1): 62-73
- [19] Rau M A, Whitaker J, Freedman J H, et al. Differential susceptibility of fish and rat liver cells to oxidative stress and cytotoxicity upon exposure to prooxidants[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, 2004, 137(4): 335-342
- [20] Banu B S, Ishaq M, Danadevi K, et al. DNA damage in leukocytes of mice treated with copper sulfate[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2004, 42(12): 1931-1936
- [21] Zastawny T H, Altman S A, Randers-Eichhorn L, et al. DNA base modifications and membrane damage in cultured mammalian cells treated with iron ions[J]. *Free Radic Biol Med*, 1995, 18(6): 1013-1022

## Toxicity and mechanism of Cu( II ), Fe( III ) and Cr( III ) against *Escherichia coli* under weak acidic conditions

XU Fangfang<sup>1,2</sup>      HUANG Manhong<sup>1</sup>      CHEN Liang<sup>1\*</sup>      KAZUO Kakii<sup>2</sup>

(1. College of Environmental Science and Engineering, Donghua University, Shanghai, 201620, China;

2. Department of Material and Environmental Chemistry, Utsunomiya University, Utsunomiya, 321-0904, Japan)

### ABSTRACT

Toxicity of three transition metal ions Cu( II ), Fe( III ) and Cr( III ) against *Escherichia coli* was investigated under weakly acidic conditions, both in the presence and absence of ascorbic acid (L-AscA). Furthermore, their cell killing mechanisms which showed great difference, were studied by electron spin resonance (ESR). L-AscA enhanced Cu( II ) and Fe( III ) but not Cr( III ) bactericidal efficiency at pH 4.0, under which all cell death was shown in 30 minutes after full contact with 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cu( II ) based on viable cell counting, and 2 hours with 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 0.2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cu( II ). Cr( III ) alone, which is widely recognized as innocuous and stable, at 0.2  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 4.0, also showed surprisingly high disinfection capability. Toxicity in the presence of L-AscA was as follows: Cu( II ) > Cr( III ) > Fe( III ). Furthermore, their cell killing mechanisms turned out to be different. Hydroxyl radical produced by Fenton-like reaction was involved in Cupric toxicity, which has been proved by ESR using the spin trapping 3,3,5,5-tetramethyl-1-pyrroline-N-oxide (M4PO). L-AscA almost doubled  $\cdot\text{OH}$  concentration produced by 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cu( II ), and  $\cdot\text{OH}$  concentration was positively related to Cu( II ). In the case of Fe( III ) and Cr( III ), no  $\cdot\text{OH}$  was detected by ESR. Their toxic mechanism is complicated and remains to be elucidated.

**Keywords:** transition metal, L-Ascorbic acid, toxicity, ESR.