# 零价纳米铁对大肠杆菌的毒性效应

王学<sup>1</sup>,李勇超<sup>1</sup>,李铁 $\lambda^{12,*}$ ,金朝 $\mu^{12}$ 

1. 南开大学环境科学与工程学院 环境污染过程与基准教育部重点实验室 ,天津 300071

2. 天津市城市生态环境修复与污染防治重点实验室,天津 300071

摘要:以大肠杆菌为研究对象,通过检测尺寸为 20 nm 的零价纳米铁暴露下大肠杆菌形貌、生长曲线和细胞内酶活性的变化,研究了零价纳米铁对大肠杆菌的毒性效应,并探讨了其可能的毒性机制。用透射电镜(TEM)观察零价纳米铁与大肠杆菌(JM109)接触后细胞的形态变化;用 0、112、560 和 1 120 mg·L<sup>-1</sup>的零价纳米铁染毒大肠杆菌细胞,测定大肠杆菌的生长曲线变化;并测定零价纳米铁染毒 24 h 后细胞培养液上清中乳酸脱氢酶(LDH)活性、细胞内超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)的含量,同时观察加入抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸(NAC)后细胞的生长变化。结果表明,零价纳米铁能够破坏细胞完整性,造成细胞损伤;抑制大肠杆菌的细胞生长,缩短大肠杆菌的对数期,延长稳定期;零价纳米铁浓度越高,大肠杆菌的稳定期越长。零价纳米铁还可导致细胞培养上清液中LDH活性显著升高,细胞内SOD活性显著下降,MDA含量显著升高,且MDA含量变化与零价纳米铁浓度存在剂量-效应关系。加入抗氧化剂 NAC 后,加 NAC 的实验组细胞数大于没加 NAC 的实验组。以上结果表明零价纳米铁的毒性机制为氧化损伤。

关键词:零价纳米铁;大肠杆菌;生长曲线;酶活性;氧化损伤 文章编号:1673-5897(2012)1-049-08 中图分类号:X171.5 文献标识码:A

# Toxicity Effects of Nano-Fe<sup>0</sup> on Escherichia coli

Wang Xue<sup>1</sup>, Li Yongchao<sup>1</sup>, Li Tielong<sup>1,2,\*</sup>, Jin Zhaohui<sup>1,2</sup>

1. Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria of Ministry of Education, College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China

2. Tianjin Key Laboratory of Environmental Remediation and Pollution Control , Tianjin 300071 , China Received 27 July 2011 accepted 19 September 2011

**Abstract**: Cytotoxicity effects and mechanism of 20 nm nano-Fe<sup>0</sup> on Escherichia coli were studied. In this paper , morphology of E. coli in the presence of nano-Fe<sup>0</sup> was observed by transmission electron microscopy (TEM). E. coli cells were exposed to 0 ,112 ,560 ,1 120 mg·L<sup>-1</sup> nano-Fe<sup>0</sup> particles. Experiments were carried out to study the inhibitive effect of nano-Fe<sup>0</sup> on E. coli growth. E. coli exposed to nano-Fe<sup>0</sup> for 24 h , the activities of lactate dehydrogenase (LDH) , cellular superoxide dismutase (SOD) , malondialdehyde (MDA) were determined. Moreover , the influence of addition of N-Acetylcysteine (NAC) on the viability of cells was studied. TEM images of E. coli cells treated with nano-Fe<sup>0</sup> nanoparticles could inhibit the growth of cells in liquid LB medium. Additionally , the shortened log phase and the prolonged stable phase of E. coli both resulted from the toxicity of nano-Fe<sup>0</sup>. Furthermore , the stable phase of E. coli is proportional to the concentration of nano-Fe<sup>0</sup> particles. The activities of LDH and the levels of MDA significantly increased and there was a linear relationship between the concentration of nano-Fe<sup>0</sup> and MDA levels , while the activities of

基金项目: 国家青年科学基金项目(20907023); 国家自然科学基金项目(40971254)

收稿日期: 2011-07-21 录用日期: 2011-09-19

作者简介:王学(1988-),女,硕士研究生,研究方向:环境污染防治与修复工作; E-mail: wangxue.0410@163.com;

<sup>\*</sup> 通讯作者( Corresponding author) , E-mail: litielong@ nankai. edu. cn

SOD significantly decreased. To nano-Fe<sup>0</sup>-NAC exposure groups , the number of cell was higher than that of simple nano-Fe<sup>0</sup> exposure groups. The results demonstrated that oxidative damage was the mechanism of nano-Fe<sup>0</sup> toxicity to E. coli. **Keywords**: nano-Fe<sup>0</sup>; Escherichia coli; growth curves; enzymes activities; oxidative damage

零价纳米铁( nanoscale zero valent iron , NZVI) 是目前应用较为广泛的一种多功能材料,与普通铁 粉相比 零价纳米铁粒径小 表面活性高 具有良好 的迁移性,可以被直接注入污染场所,能够更有效地 降解污染物[1-2],其在原位修复技术中具有不可比 拟的优势<sup>[34]</sup>。但其特殊的物理化学性质可能会对 人类健康和生态环境造成负面影响。如 You 等<sup>[5]</sup> 实验证实 零价纳米铁粒子可以迅速地杀死水体中 的病毒。Lee 等<sup>[6]</sup>从零价纳米铁和大肠杆菌细胞接 触后的透射电镜图(TEM)中发现当大肠杆菌暴露 在零价纳米铁中时 细胞膜会发生破碎 致使微生物 失活;9 mg•L<sup>-1</sup>的零价纳米铁染毒大肠杆菌 10 min, 对细胞的灭活率  $lg(N_0/N)$  为 3.4( $N_0$ 为零价纳米铁 与大肠杆菌接触前菌落数 N 为零价纳米铁与大肠 杆菌接触后菌落数) 而相同条件下 lg•L<sup>-1</sup>零价铁 粉染毒细胞 1 h 后 对细胞的灭活率  $lg(N_0/N) < 0$ . 1 这说明零价纳米铁的毒性远远大于零价铁粉的毒 性。Keenan<sup>[7]</sup>根据零价纳米铁染毒微生物后细胞 内的活性氧物质(reactive oxygen species, ROS) 含量 变化推测零价纳米铁的毒性机制为零价纳米铁和分 子氧(O<sub>2</sub>)反应产生了大量的氧化物和过氧化物,使 细胞内的氧化压力增加 从而导致细胞毒性。

虽然国内外学者的一些研究证实了零价纳米铁 会对微生物产生毒性影响,但是对于零价纳米铁的 毒性效应和机理的研究还不全面。目前对于零价纳 米铁的毒性效应研究方面多侧重于零价纳米铁对微 生物的致死率和细胞内活性氧自由基的含量变化实 验,对于零价纳米铁对细菌生长周期的影响以及对 细胞酶活性和脂质过氧化产物的影响还是一个研究 空白。纳米材料的毒性效应研究包括很多方面,不 仅是宏观方面还有微观方面,不仅要研究致死率和 最终 ROS 含量,还要研究其对微生物的生长周期、 酶活性和脂质过氧化产物等因素的影响<sup>[842]</sup>。

为了更加全面和明确地了解零价纳米铁的毒性 效应和机制,本研究拟通过制备在培养液中分散的 零价纳米铁悬浮液,使用不同浓度的零价纳米铁处 理大肠杆菌(JM109)细胞,考察零价纳米铁对典型 环境微生物——大肠杆菌细胞形态、生长周期及生 化指标的影响,并比较加入抗氧化剂 N-乙酰半胱氨 酸(NAC) 后细胞生长的变化,以期明确零价纳米铁 毒性效应及毒性与浓度的量效关系,为了解零价纳 米铁的毒性机制提供参考数据。

## 1 材料与方法(Materials and methods)

# 1.1 试剂与仪器

试剂: FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O,KBH<sub>4</sub>,聚乙二醇,无水乙醇 等试剂均为分析纯。用于配制磷酸盐缓冲液(PBS) 的试剂 KCl、NaCl、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>和 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•12H<sub>2</sub>O 均为 分析纯。抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸(NAC,纯度 > 99%)购自上海生工生物工程有限公司。超氧化物 歧化酶(SOD)测试盒、考马斯亮兰蛋白测定试剂盒、 丙二醛(MDA)测定试剂盒、乳酸脱氢酶(LDH)测 定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。实验培养 液为 LB 培养液,培养液组成: 10 g•L<sup>-1</sup>胰蛋白胨 5 g•L<sup>-1</sup>酵母提取物,10 g•L<sup>-1</sup> NaCl。

主要仪器: SW-CJ-IG 超净工作台(苏州净化科 学仪器厂); THZ-82B 汽浴恒温震荡器(江苏省金坛 市医疗仪器厂); Cary50 型紫外可见分光光度计(美 国 VARIAN 公司); RJ-TGL-16-II 台式高速离心机 (无锡市瑞江分析仪器有限公司); VCX130 超声波 破碎仪(美国 Sonies 公司); 250-D 恒温培养箱(江苏 省常州国华电器有限公司); YQX-II 厌氧培养箱(上 海福玛实验设备有限公司); Philips EM400ST 型透 射电镜(Philips 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 零价纳米铁悬浮液的制备和表征

采用 Wang 等<sup>[13]</sup> 提出的液相还原法制备零价 纳米铁。在氮气保护下,在醇-水体系中用  $KBH_4$ 还 原  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,反应方程式为:

 $\mathrm{Fe}^{^{2}+} + 2\mathrm{BH}_{4}^{-} + 6\mathrm{H}_{2}\mathrm{O} = \mathrm{Fe}^{^{0}} + 2\mathrm{B(OH)}_{3} + 7\mathrm{H}_{2} \uparrow$ 

反应完成后,用脱氧去离子水洗涤3次,得到零 价纳米铁粒子。将零价纳米铁放置于 LB 培养液 中,得到零价纳米铁的悬浮液。表征时将溶液滴在 铜网上,利用 Philips EM400ST 型透射电镜对这些纳 米粒子进行形貌分析和粒径分析。

1.2.2 大肠杆菌的培养及生长曲线的测定

大肠杆菌培养方法为以 LB 培养液为培养基, 37℃振荡培养至对数生长期备用。生长曲线的测定 方法为:将少量细菌接种到一定体积的、含有不同浓 度零价纳米铁的新鲜培养基中,在汽浴恒温震荡器 中37℃进行培养,分别于0、1.5、3、4、6、8、10、12、 14、16、20和24h测定培养液中的细菌量,以蒸馏水 为对照测定600 nm<sup>[14]</sup>处的吸光值(OD<sub>600</sub>),以细菌 的吸光度值作纵坐标,生长时间作横坐标,绘制生长 曲线。将不同时间取出的菌液经适当稀释后,取一 定量的稀释液接种到平板上,置于恒温培养箱中培 养48h,统计菌落数。以上实验均有2个平行样。

将抗氧化剂 NAC 溶解于 PBS 配制成 10 g•L<sup>-1</sup> 的 NAC 溶液 经过滤(0.22 μm 滤膜) 除菌后 在实 验组中加入 2 mL NAC 在对照组中加入等量的 PBS 溶液 测定各个体系中大肠杆菌生长曲线,方法 同上。

1.2.3 细胞酶活性的检测及形态变化表征

在厌氧(置于厌氧培养箱中)条件下,用浓度分 别为 0、112、560 和 1 120 mg·L<sup>-1</sup>的零价纳米铁悬浮 液染毒处理大肠杆菌细胞 24 h 后,离心收集培养液 上清,按照 LDH 试剂盒使用说明进行检测;细胞经 过超声波破碎仪以振幅 14 µm 超声处理 30 s 后,按 照考马斯亮兰蛋白测定试剂盒、SOD 和 MDA 试剂 盒操作说明测定细胞内的蛋白质含量、SOD 活性和 MDA 含量。LDH 酶活力单位定义为: 1 000 mL 血 清(浆) 37℃与基质作用 15 min,在反应体系中产生 1 µmol 丙酮酸为 1 单位; SOD 酶活力单位定义为: 每 mg 组织蛋白在 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为 1 个酶活力单位(U); MDA 以每 mg 组织蛋白中 MDA 数表示。

为进一步探索零价纳米铁产生细胞毒性的机制, 了解零价纳米铁是否破坏细胞的完整性,本文利用透 射电镜(TEM)观察大肠杆菌菌液与零价纳米铁(112 mg•L<sup>-1</sup>)接触前和接触1h后细胞的形态变化。

1.3 数据分析

实验数据表示为平均值 ±标准差(Mean ± SD), 采用 SPSS 11.5 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA) 处理组与对照组间的差异显著性检验采 用 Dunnet't 法 ,p < 0.05 表示差异显著; Pearson 检 验相关性;使用 Origin 8.0 作图。

# 2 结果(Results)

# 2.1 零价纳米铁颗粒和大肠杆菌的表征

由图 1 可知,实验制备的零价纳米铁颗粒为粒 径 20 nm 左右的球状粒子,颗粒间有不同程度的粘 连,这是由于磁性纳米粒子受地磁力、小粒子间的静 磁力及表面张力的共同作用,容易发生团聚<sup>[15]</sup>。需 要指出的是 这种团聚现象并不会明显地影响实验 结果<sup>[16]</sup>。



图 1 零价纳米铁颗粒的透射电镜照片 Fig. 1 TEM microphotograph of NZVI

图 2 为零价纳米铁与大肠杆菌接触前后的 TEM 图。由图 2a 可以看出,在无零价纳米铁存在 时,大肠杆菌细胞为杆状,宽度约为 0.2 μm,长度约 为 0.8 μm,细胞周围均匀、光滑。与零价纳米铁接 触 1 h 后,可以看到大肠杆菌周围吸附了一些零价 纳米铁颗粒(图 2b 箭头处),且细胞表面变得模糊 并明显破损,细胞膜出现凹陷(图 2c)。



图 2 大肠杆菌与零价纳米铁接触前(a)和接触后(b、c)的 TEM 图([NZVI]=112 mg·L<sup>-1</sup> 接触时间为1h) Fig. 2 TEM microphotographs of (a) native E. coli cells and treated cells with nano-Fe<sup>0</sup>(b c)

# 2.2 零价纳米铁对大肠杆菌生长曲线的影响

大肠杆菌在不同浓度零价纳米铁中的生长曲线 如图 3 所示。从图中可以看出,零价纳米铁可以抑 制大肠杆菌的生长。在前 3 h 实验组大肠杆菌吸光 度与 0 mg·L<sup>-1</sup>的对照组相比没有明显变化; 3 h 后, 对照组和 112 mg·L<sup>-1</sup>零价纳米铁体系进入对数期, 对数期持续 10 h 稳定期为 6 h; 但是 112 mg·L<sup>-1</sup>零 价纳米铁体系中的大肠杆菌生长速度小于对照组。 560 和 1 120 mg·L<sup>-1</sup>体系大肠杆菌直到第 8 小时才 进入对数期。其中 560 mg·L<sup>-1</sup>体系对数期持续 4 h 稳定期为 8 h; 而 1 120 mg·L<sup>-1</sup>体系对数期包持续 2 h 稳定期为 10 h。另外计算各个体系最后的吸光 度大小,得出 112、560 和 1 120 mg·L<sup>-1</sup>体系相比于 对照组的吸光度降低率分别为 20%、44% 和 66%。



图 3 零价纳米铁对大肠杆菌生长的影响 Fig. 3 Effect of NZVI on growth of E. coli

由于生长曲线的测定是根据菌液的吸光度来确 定大肠杆菌的生长情况,因此吸光度反映的结果为 活细胞和死细胞的总和。为了更好地了解体系中活 细胞的生长情况,本文还利用了平板计数法测定零 价纳米铁对活细胞的影响。从图4中可以看出,对 照组细胞数随着时间的延长不断增长,到第14小时 细胞数量最大,此时也为细胞生长曲线的对数期吸 光度最大点,14 h以后,细胞数量开始减少。112 mg •L<sup>-1</sup>体系中细胞生长规律和对照组相似,但是菌落 数小于对照组,这说明在此浓度下,零价纳米铁对活 细胞的影响还不明显。560 和1 120 mg•L<sup>-1</sup>体系细 胞数量在4~6 h 有小幅度的增加,但是最终的细胞 数量与对照组相比大大减少,这说明 560 和1 120 mg•L<sup>-1</sup>浓度的零价纳米铁对细胞的毒性较大,从而 抑制了细胞生长。



Fig. 4 Effect of NZVI on number of E. coli colonie

 2.3 零价纳米铁对大肠杆菌细胞酶活性的影响 大肠杆菌细胞经不同浓度零价纳米铁悬浮液染 毒处理 24 h 后 其 LDH、SOD 和 MDA 的变化情况分 别如图 5、6 和 7 所示。



#### 图 5 零价纳米铁对大肠杆菌 LDH 活性的影响

(\* 表示与对照组(0 mg・L ⁻¹)比较 ₯ <0.05)

Fig. 5 Effect of NZVI on LDH activity of E. coli cells

LDH 是反映细胞膜损伤和细胞膜通透性升高 的一项比较灵敏的指标,由图5可知,染毒组细胞培 养液上清中的 LDH 活性显著高于对照组(p < 0. 05),112、560和1120mg·L<sup>-1</sup>体系中 LDH 活性分 别约为对照组的3倍、5倍和15倍,此结果表明零 价纳米铁会导致细胞膜损伤和细胞膜通透性增加, 且零价纳米铁浓度越高,细胞破损越严重。SOD 是 细胞内重要的抗氧化酶,当活性氧自由基大量积累 会影响 SOD 酶活性,因此 SOD 活性的高低可以间接 反映机体清除氧自由基的能力<sup>[17]</sup>。由图6可知,SOD 活性随纳米铁暴露浓度的增加均有不同程度的降低,

52

这说明零价纳米铁染毒大肠杆菌会产生自由基,且零 价纳米铁浓度越高,自由基产生量越大。活性氧自由 基可以攻击生物膜上的不饱和脂肪酸引起脂质过氧 化反应,并产生 MDA 等代谢产物。MDA 作为细胞发 生脂质过氧化反应的代表性产物,可以通过测定其 含量变化来了解脂质过氧化水平<sup>[18]</sup>。图7中染毒 组细胞中 MDA 含量明显高于对照组,且 MDA 含量 变化 与零价纳米铁浓度存在剂量-效应关系 (r=0.945,p<0.05)。这表明零价纳米铁可以导 致细胞发生脂质过氧化反应,产生氧化损伤。



图 6 零价纳米铁对大肠杆菌 SOD 活性的影响





图 7 零价纳米铁对大肠杆菌 MDA 含量的影响 Fig. 7 Effect of NZVI on MDA content in E. coli cells

为了验证活性氧物质(ROS)产生的氧化损伤是 否是零价纳米铁产生毒性的原因,本研究中加入了 具有干扰自由基生成的抗氧剂 N-乙酰半胱氨酸 (NAC),然后测定零价纳米铁对大肠杆菌生长的影 响。从图 8 可以看出,对照组在加入 NAC 后吸光度 与未加 NAC 吸光度相比没有太大变化,112、560 和 1 120 mg·L<sup>-1</sup>实验组加入 NAC 的大肠杆菌吸光度 要大于没有加入 NAC 的菌液吸光度 吸光度增长率 分别为 32%、10% 和 16%,这表明氧化损伤确实是 零价纳米铁产生细胞毒性的原因,但是 NAC 抗氧化 作用在零价纳米铁浓度较低时(112 mg·L<sup>-1</sup>)比较 显著,当零价纳米铁浓度较高时(560 和 1 120 mg· L<sup>-1</sup>),抗氧化作用较小,原因可能是高浓度时零价 纳米铁产生的自由基量较大,超过了 NAC 的清除能 力,导致 NAC 不能更有效地减缓零价纳米铁的毒性 作用。



图 8 零价纳米铁和 NAC 联合作用下对大肠杆菌的生长影响 Fig. 8 Effect of NZVI + NAC on growth of E. coli

### 3 讨论(Discussion)

### 3.1 零价纳米铁对大肠杆菌细胞形态的影响

本实验采用的零价纳米铁是由液相还原法制得 的产品,粒径约为 20 nm,并且具有巨大的比表面 积。高的表面能和范德华力使得零价纳米铁很容易 吸附到细菌的表面。实验采用 TEM 观察了大肠杆 菌细胞与零价纳米铁接触前后的形貌对比图(图 2)。从 TEM 图中可以看出,在无纳米铁投加的情况 下,该细菌呈现规则并且清晰的椭圆状形貌,大小约 为0.2×0.8 μm。当细菌与零价纳米铁混合后,其 表面明显吸附了一些纳米铁颗粒,且大肠杆菌细胞 表面出现凹陷,形状变的不规则。零价纳米铁是一 种强还原剂,可能被细胞内的分子氧氧化发生 Fenton 反应从而导致细胞氧化损伤。同时零价纳米铁 也存在穿透细胞膜进入细胞内部的可能性<sup>[6,19]</sup>,这 需要后续的细胞切片观察才能得到理论依据。

3.2 零价纳米铁对大肠杆菌生长曲线的影响 从图 3 可以看出,零价纳米铁对大肠杆菌生长 周期影响越大。原因可能为零价纳米铁抑制细胞生 长,减少进入稳定期的活菌数。细胞数量越少 消耗 培养液中的营养成分越少,细胞可以利用剩余的营 养物质维持稳定期的生长,因此染毒组细胞的稳定 期时间要长于对照组。这和陈灏等<sup>[20]</sup>研究纳米 TiO<sub>2</sub>水悬浮液对大肠杆菌生长的影响结论相似。

# 3.3 零价纳米铁对大肠杆菌细胞酶活性的影响

LDH 为胞浆酶,当细胞膜受损或通透性增加时 可漏出至细胞外,导致细胞外液中 LDH 的活性明显 增加。因此,细胞培养液上清中 LDH 活性的大小可 反映细胞膜的受损程度,而膜通透性的改变是许多 毒性物质作用于细胞膜时的一种常见的早期反应, 能够反映细胞的损伤程度<sup>[21-22]</sup>。由 LDH 检测结果 (图 5)可知,染毒组细胞培养液上清中的 LDH 活性 显著高于对照组(p < 0.05),这表明零价纳米铁能 够破坏细胞膜的完整性,从而对细胞造成损伤。

Nel 等<sup>[23]</sup>在《Science》杂志上发表综述文章提 出活性氧的生成和氧化应激反应是纳米材料引起多 种生物毒性效应的主要方式。从纳米材料本身的特 性来看 颗粒的尺寸越小,其表面积就越大,颗粒表 面电子受体和供体活动位点就越多。纳米颗粒表面 的电子受体和供体活动位点能与分子氧 $(0_2)$ 发生 作用 形成超氧离子 并通过歧化反应产生过量的活 性氧物质(reactive oxygen species, ROS),其包括 O<sup>2</sup>·-、NO 等自由基产物以及 H₂O₂、ONOO - 等非自由 基产物 ROS 的增多可造成蛋白质、DNA 和脂质损 伤。SOD 是一种清除超氧阴离子(O<sup>2</sup>·)的特异性 酶 能够与 O<sup>2</sup>· 作用发生歧化反应 ,将其分解为 H<sub>2</sub> O<sub>2</sub>和 O<sub>2</sub> 对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要 的作用<sup>[24-25]</sup> 其活力的降低提示机体内自由基产生 增加。丙二醛(MDA)作为细胞发生脂质过氧化反 应的代表性产物 是氧化损伤的标记物 它可以与蛋 白质、核酸(DNA、RNA)和磷脂等含有氨基的生物 大分子发生交联,严重的损伤组织细胞的膜性结构, 影响膜的功能 从而导致组织细胞功能的损伤 其生 成量是一个反映体内 ROS 生成量的间接指标<sup>[26-27]</sup>。

从图 6 可以看出,实验组中 SOD 活性均低于对 照组(p < 0.05);由图 7 可知,实验组细胞中的 MDA 含量显著高于对照组(p < 0.05),且 MDA 含量与零 价纳米铁浓度存在剂量-效应关系(r = 0.945, p < 0.05)。该结果表明,零价纳米铁会导致细胞产生 过量的 ROS,致使细胞内氧化和抗氧化状态失去平 衡,发生氧化应激反应,降低了细胞内 SOD 活性,产 生脂质过氧化产物 MDA,最终导致细胞受损,细胞 胞浆酶 LDH 漏出。从图 8 中可以看出,加入 NAC 的体系大肠杆菌的吸光度要大于没有加入 NAC 的 体系。NAC 是一种含有巯基的抗氧化剂,具有干扰 自由基生成,清除已生成的自由基的作用。NAC 能 够有效地减缓零价纳米铁对大肠杆菌细胞的毒性作 用 验证了氧化损伤为零价纳米铁的毒性机制之 -<sup>[28]</sup>。零价纳米铁产生活性氧物质的机理可由以 下化学方程式表示<sup>[29]</sup>:

$$\begin{split} & \operatorname{Fe}_{(s)}^{0} + \operatorname{O}_{2} + 2\operatorname{H}^{+} \longrightarrow \operatorname{Fe}(\operatorname{II}) + \operatorname{H}_{2}\operatorname{O}_{2} \\ & \operatorname{Fe}_{(s)}^{0} + \operatorname{H}_{2}\operatorname{O}_{2} + 2\operatorname{H}^{+} \longrightarrow \operatorname{Fe}(\operatorname{II}) + 2\operatorname{H}_{2}\operatorname{O} \\ & \operatorname{Fe}(\operatorname{II}) + \operatorname{O}_{2} \longrightarrow \operatorname{Fe}(\operatorname{III}) + \operatorname{O}^{2\bullet^{-}} \\ & \operatorname{Fe}(\operatorname{II}) + \operatorname{O}^{2\bullet^{-}} + 2\operatorname{H}^{+} \longrightarrow \operatorname{Fe}(\operatorname{III}) + \operatorname{H}_{2}\operatorname{O}_{2} \\ & \operatorname{Fe}(\operatorname{II}) + \operatorname{H}_{2}\operatorname{O}_{2} \longrightarrow \operatorname{oxidant} \end{split}$$

综上所述 ,零价纳米铁可以破坏细胞膜的完整 性 ,造成细胞破损;抑制大肠杆菌的生长 ,缩短细菌 生长的对数期 ,促进大肠杆菌较早进入稳定期;影响 细胞内活性氧与抗氧化物质的动态平衡 ,进而产生 自由基和脂质过氧化物 ,产生细胞毒性。因此氧化 损伤是零价纳米铁的毒性机制之一。

通讯作者简介:李铁龙(1977—) 男 环境科学博士 副教授 主 要研究方向为环境污染与防治 发表学术论文 80 余篇。

#### 参考文献:

- [1] Nurmi J T , Tratnyek P G , Saratry V , et al. Characterization and properties of metallic iron nanoparticles: Spectroscopy , electrochemistry , and kinetics [J]. Environmental Science & Technology ,2005 ,39(5): 1221 – 1230
- [2] 贾汉忠,宋存义,李晖. 纳米零价铁处理地下水污染技术研究进展[J]. 化工进展,2009,28(11): 2028-2034
  Jia H Z, Song C Y, Li H. Research progress of ground water treatment technology of nano-scale zero valent iron
  [J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2009,28(11): 2028-2034 (in Chinese)
- [3] Zhang W X. Nanoscale iron particles for environmental remediation: An overview [J]. Journal of Nanoparticle Research , 2003 , 5(3-4): 323 - 332
- [4] Masciangioli T, Zhang W X. Environmental nanotechnology: potential and pitfalls [J]. Environmental Science & Technology, 2003, 37(5): 102A - 108A
- [5] You Y , Han J , Chio P C , et al. Removal and inactivation

of waterborne viruses using zerovalent iron [J]. Environmental Science & Technology, 2005, 39(23): 9263-9269

- [6] Lee C, Kim J Y, Lee W I, et al. Bactericidal effect of zerovalent iron nanoparticles on Escherichia coli [J]. Environmental Science & Technology ,2008, 42(13): 4927 - 4933
- [7] Keenan C R , Goldstein R G , Lucas D , et al. Oxidative stress induced by zero-valent iron nanoparticles and Fe(II) in human bronchial epithelial cells [J]. Environmental Science & Technology ,2009 ,43(12): 4555 - 4560
- [8] 谢小保,李文茹,曾海燕,等.纳米银对大肠杆菌的抗菌 作用及其机制[J].材料工程,2008,53(10):106-109
  Xie X B, Li W R, Zeng H Y, et al. Study of antimicrobial activity and mechanism of silver nanoparticles on Escherichia coli [J]. Journal of Materials Engineering, 2008,53(10): 106-109 (in Chinese)
- [9] Lu S, Rodger D, Craig P, et al. Efficacy of simple short-term in vitro assays for predicting the potential of metal oxide nanoparticles to cause pulmonary inflammation [J]. Environmental Health Perspectives, 2009, 117(2): 241-247
- [10] Tian X , Michael K , Monty L , et al. Cationic polystyrene nanosphere toxicity depends on cell-specific endocytic and mitochondrial injury pathways [J]. ACS Nano ,2008 ,2(1): 85 –96
- [11] Zhang Y , Syed F A , Enkeleda D , et al. Cytotoxicity effects of graphne and single-wall carbon nanotubes in neural phaeochromocytoma-derived PC12 cells [J]. ACS Nano , 2010 , 4(6): 3181 – 3186
- [12] Li Q , Tang M , Ma M , et al. Study on cytotoxicity and oxidative effects of different sizes of hematite (  $\rm Fe_2O_3)$  nanoparticles on CHL cell in vitro [J]. China Journal of Modern Medicine , 2005 , 15( 13) : 1921 – 1926
- [13] Wang W, Jin Z H, Li T L, et al. Preparation of spherical iron nanoclusters in ethanol water solution for nitrate removal [J]. Chemosphere, 2006, 65(8): 1396-1404
- [14] Sezonov G , Joseleau-Petit D , D'Ari R. Escherichia coli physiology in Luria-Bertani broth [J]. Journal of Bacteriology , 2007 , 189(23): 8746 - 8749
- [15] Zhang L , Manthiram A , Chains composed of nanosize metal particles and identifying the factors driving their formation [J]. Applied Physics Letters , 1997 , 70 (18): 2469 - 2471
- [16] Auffan M, Achouak W, Rose J, et al. Relation between the redox state of iron-based nanoparticles and their cytotoxicity toward Escherichia coli [J]. Environmental Science & Technology, 2008, 42(17): 6730-6735
- [17] 李志斐,龚望宝,谢骏,等. 三甲基氯化锡对斑马鱼
   生理生化特性的影响[J]. 生态毒理学报,2011,6
   (3): 255-260

Li Z P , Gong W B , Xie J , et al. Effects of trimethyltin

chloride on physiological and biochemistrical characteristics of Danio rerio [J]. Asian Journal of Ecotoxicology , 2011, 6(3): 255 - 260 (in Chinese)

[18] 王舟,曾令福,肖元梅,等.绿茶抗辐射损伤作用研究 [J].四川大学学报:医学版,2003,34(2):303-305

Wang Z , Zeng L F , Xiao Y M , et al. Protective effects of green tea on mice with the irradiating damage induced by Gamma-ray [J]. Journal of Sichuan University: Medical Sciences Edition ,2003 ,34(2): 303 – 305 (in Chinese)

- [19] Xiu Z M , Jin Z H , Li T L , et al. Effects of nano-scale zerovalent iron particles on a mixed culture dechlorinating trichloroethylene [J]. Bioresource Technology , 2010 , 101(4): 1141 – 1146
- [20] 陈灏,谷立坤,刘雷,等. 纳米 TiO<sub>2</sub>水悬浮液对大肠杆菌 生长的影响[J]. 环境科学学报,2009,29(5):919-923 Chen H, Gu L K, Liu L, et al. Effect of nano TiO<sub>2</sub> water suspension on the growth of Escherichia coli [J]. Acta Scientiae Circumstantiae,2009,29(5):919-923 (in Chinese)
- [21] 张水华,梅其炳,马璟. 纳米四氧化三铁、碳纳米管 对 A549 细胞的毒性研究[J]. 毒理学杂志,2008,22
   (5): 365 - 367

Zhang S G , Mei Q B , Ma J. Study on cytotoxicity of nano ferroferric oxide and carbon nanotubes in A549 cells [J]. Journal of Toxicology , 2008 , 22(5): 365 - 367 (in Chinese)

[22] 杨辉,杨丹凤,张华山,等.4 种典型纳米材料对小 鼠胚胎成纤维细胞毒性的初步研究[J].生态毒理学 报,2007,2(4):428-434

Yang H , Yang D F , Zhang H S , et al. Study on cytotoxicity of four typical nanomaterials in mouse embryo fibroblasts [J]. Asian Journal of Ecotoxicology , 2007 , 2 (4):428-434 (in Chinese)

- [23] Nel A , Xia T , Li N. Toxic potential of materials at the nano level [J]. Science ,2006 ,311(5761): 622 - 627
- [24] 田文静,白伟,赵春禄,等.纳米ZnO对斑马鱼胚胎 抗氧化酶系统的影响[J].中国环境科学,2010,30 (5):705-709

Tian W J , Bai W , Zhao C L , et al. Effects of ZnO nanoparticles on antioxidant enzyme system of zebrafish embryos [J]. China Environmental Science , 2010 , 30 (5): 705 – 709 ( in Chinese)

- [25] 朱小山,朱琳,郎宇鹏,等.人工纳米材料富勒烯 (C<sub>60</sub>)低剂量长期暴露对鲫鱼的氧化伤害[J].环境 科学,2008,29(4):855-861
  - Zhu X S , Zhu L , Lang Y P , et al. Oxidative damages of long-term exposure to low level fullerenes (C<sub>60</sub>) in Carassius auratus [J]. Environmental Science , 2008 , 29 (4): 855 – 861 ( in Chinese)

[26] 李岩,彭光银,何胡军,等.碳纳米管导致小鼠肺部

急性氧化损伤作用的研究 [J]. 生态毒理学报, 2006,1(4):357-361

- Li Y, Peng G Y, He H J, et al. Study on carbon nano– tube induced acute pulmonary oxidative damage in mice
  [J]. Asian Journal of Ecotoxicology ,2006,1(4): 357 - 361( in Chinese)
- [27] 熊道文,方涛,陈旭东,等.纳米材料对斑马鱼的氧 化损伤及应激效应研究[J].环境科学,2010,31 (5):1320-1327
  - Xiong D W , Fang T , Chen X D , et al. Oxidative stress effects and damage of nanoscale  ${\rm TiO}_2$  and ZnO on ze–

brafish [J]. Environmental Science , 2010 , 31 (5): 1320 - 1327( in Chinese)

- [28] Gillissen A , Scharling B , Jaworska M , et al. Oxidant scavenger function of ambroxol in vitro: a comparison with N-acetyleysteine [J]. Research in Experimental Medicine , 1997 , 196(3): 389 – 393
- [29] Keenan C R , Sedlak D L. Factors affecting the yield of oxidants from the reaction of nanoparticulate zero-valent iron and oxygen [J]. Environmental Science & Technology , 2008 , 42(4): 1262 - 1267 ◆