

黄 志, 颜 未, 蒯琳萍. 钴铯锶 3 种核素对大肠杆菌的毒性研究[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(6): 288–293.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.06.061

钴铯锶 3 种核素对大肠杆菌的毒性研究

黄 志, 颜 未, 蒯琳萍

(上海交通大学核科学与工程学院, 上海 200240)

摘要:为了研究核电站建设运营、矿源开采等行为对周边环境的影响,以大肠杆菌为对象,通过绘制生长曲线以及 MTT(噻唑蓝)法定量测量钴(Co)、铯(Cs)、锶(Sr)3 种核素对大肠杆菌的毒性作用,得到了钴、铯、锶 3 种核素与大肠杆菌的剂量-抑菌率关系,同时通过测定细胞壁通透性以及胞内活性氧含量,发现这 3 种离子对大肠杆菌的抑菌作用与细胞壁通透性以及胞内活性氧的积累可能存在正相关关系。结果表明, Co^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Cs^{+} 对大肠杆菌的半致死浓度分别为 3.38、251、1 600 mg/L,其金属毒性由强到弱顺序为 $\text{Co}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Cs}^{+}$,并且 Sr^{2+} 对大肠杆菌生长具有双向性影响,低浓度(< 10 mg/L)时表现为促进生长作用,而浓度增高则表现为抑制作用。 Co^{2+} 的抑菌作用与大肠杆菌细胞壁通透性增大有关,而 Sr^{2+} 、 Cs^{+} 的抑菌作用通过金属离子诱导细胞体内活性氧含量增大,从而抑制细菌生长。从宏观层面反应了 3 种核素的金属毒性,并从微观层面进行了机理的探讨,为后续研究钴、铯、锶等核素对生物体的致毒效应以及环境中核素的生物监测方法提供参考依据。

关键词:Co;Sr;Cs;金属毒性;大肠杆菌;活性氧含量;细胞壁通透性

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)06-0288-06

随着核技术在军事、工农业、科研等领域的广泛应用,由泄漏物质造成的放射性污染以及钴、铯、锶等金属产生的金属毒性对周边水域的影响也引起了广泛的关注^[1]。我国核工业高速发展使得核电站的建设已经成为我国能源战略中的一项重要议事,而内陆核电站的建设更是面临着更严格的安全考量。由于内陆核电站受纳水体体积小,一旦发生泄漏,将对周围居民的生活带来巨大的影响,因此为保证环境污染水平监测的可靠性,内陆核电站需要更多的科学评价标准^[2]。同时由于磷酸盐矿、煤矿、铁矿等矿源经常伴随着天然核素的存在,这些矿源的开采利用也将会对环境带来污染^[3]。核素通过扩散迁移流入到生态环境中,最终会对人类健康产生各种影响^[4-5],因此需要采取有效的手段进行污染检测。生物监测可作为一项重要的手段,能够更加客观地评价内陆核电站在正常运行、事故工况以及退役过程中释放的核素对环境产生的影响^[6]。同时,随着核能源的大力发展,核废料的处理量也在逐年增长,而原料的开采以及废料的处理,均不可避免

地会对周围环境造成一定的影响,尤其是像钴、铯、锶等核素,如何评价这些核素对环境的影响也成了当务之急。

作为自然界中数量最多、生物量最大、对生命元素循环具有最大影响的种群,在水体环境监测上,微生物具有得天独厚的优势^[7]。低等微生物对环境包括核素在内的金属污染物、有机化合物等污染会表现得更加敏感,它们能够最快地感受到生态系统中环境质量的变化,并通过相关机制做出反应。因此,微生物被认为是最有潜力的指示生物^[8]。大肠杆菌是重要的微生物研究材料,也是重要的环境污染指示菌,以大肠杆菌为研究对象,能够更普遍地反应核素泄漏对环境的影响,也能够通过跟踪污染区域的大肠杆菌生长情况来评估该区域的污染程度。

MTT(噻唑蓝)比色法一般用于细胞活性检测,利用双波长法可以有效地去除包括死菌体、培养基在内的干扰物对试验的影响^[9]。传统的平板计数工作量大,耗时长,与之相比,MTT 法工作量小,操作快捷并且重复性高,已经广泛应用于细胞毒性试验。近年来 MTT 法也越来越多地应用于活菌数的测量,本试验利用 MTT 法测量大肠杆菌的存活率,数据可靠且重复性高。

目前,在农药等污染领域中,将微生物作为污染指示生物的相关研究已经取得了令人瞩目的成就^[10]。然而,在核素污染领域,选用微生物进行生物监测的研究鲜有报道。本试验通过研究 Co、Sr、Cs3 种核素外源添加对大肠杆菌生长速率

收稿日期:2017-12-06

基金项目:国家自然科学基金(编号:11575114)。

作者简介:黄 志(1993—),男,湖北武汉人,硕士研究生,主要从事辐照对环境中微生物影响的研究。E-mail:freedomstjhz@163.com。

通信作者:蒯琳萍,博士,教授,主要从事环境微生物、微生物生态学。E-mail:sjtu-lkuai@qq.com。

[27] 卢 佳,胡正义. 围海造田长期耕种稻田和旱地土壤氮矿化速率及供氮潜力比较[J]. 植物营养与肥料学报,2010(1):62-70.

[28] 李 铭,朱利川,张全发,等. 不同土地利用类型对丹江口库区土壤氮矿化的影响[J]. 植物生态学报,2012,36(6):530-538.

[29] Chen S X, Wang G B, Hong - Hua R, et al. Seasonal variations of

soil nitrogen mineralization under different land - use types in a coastal area in northern Jiangsu, China [J]. Chinese Journal of Ecology, 2014, 32(10):276-282.

[30] Verhoeven J T A, Maltby E, Schnitz M B. Nitrogen and phosphorus mineralization in fens and bogs [J]. Journal of Ecology, 1990, 78(3):713-726.

的影响,定性反映核素对大肠杆菌的抑制作用,再利用 MTT 法定量检测 3 种核素对大肠杆菌的半致死浓度,最后从细胞壁通透性变化以及氧化损伤 2 个方面研究钴、铯、锶 3 种金属离子的致毒机理,为核电站泄漏污染物的生物监测提供相关参考依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

大肠杆菌(*Escherichia coli* - DH5 α):2017 年 6 月购置于上海交通大学农业与生物学院,并于农业生物学院资源环境实验室完成本试验。

1.2 仪器

紫外分光光度计、实验室高压蒸汽灭菌锅、恒温培养箱、振荡涡旋器、水浴摇床、酶标仪、冷冻离心机、移液枪和超净工作台。

1.3 试剂

金属离子均为氯化物:氯化钴、氯化铯、氯化铯。相关研究表明,不同阴离子对金属离子的毒性有不同影响,在研究较为广泛的 Cl $^{-}$ 、NO $_3^{-}$ 、OAc $^{-}$ 这 3 种阴离子中,氯离子对金属离子毒性影响较小^[1]。其他试剂:MTT(噻唑蓝)、二甲亚砜(DMSO)、磷酸盐缓冲溶液(PBS)、氯化钠、活性氧 ROS 检测试剂盒、碱式磷酸酶检测试剂盒。

1.4 培养基

R2A 液体培养基:胰蛋白胨 0.25 g,酸水解酪蛋白 0.5 g,酵母浸粉 0.5 g,可溶性淀粉 0.5 g,磷酸氢二钾 0.3 g,硫酸镁 0.1 g,丙酮酸钠 0.3 g,蛋白胨 0.25 g,葡萄糖 0.5 g,蒸馏水 1 000 mL 自然溶解,pH 值为 7.1~7.3。试验前需要 121 $^{\circ}$ C 高温灭菌 20 min。

1.5 试验方法

1.5.1 浓度梯度培养基配制 反应体系总体积均为 100 mL,体系营养成分均为 R2A 液体培养基,加入适量金属离子溶液,配制不同浓度梯度金属离子液体培养基:Co $^{2+}$ 液体培养基中 Co $^{2+}$ 浓度分别为 0(对照组)、5、10、20、40 mg/L;Cs $^{+}$ 液体培养基中铯离子浓度分别为 0(对照组)、10、100、1 000、2 000 mg/L;Sr $^{2+}$ 液体培养基中 Sr $^{2+}$ 浓度分别为 0(对照组)、10、100、1 000、2 000 mg/L。通过绘制各金属离子胁迫下大肠杆菌的生长曲线,来确定最佳孵育时间以及后续试验的浓度范围。

MTT 法定量测量核素的金属毒性中,根据生长曲线判断合适的离子浓度。此时的浓度梯度设置为 Co $^{2+}$ 液体培养基中 Co $^{2+}$ 浓度分别为 0(对照组)、1、2.5、5、10、15、20 mg/L;Cs $^{+}$ 液体培养基中 Cs $^{+}$ 浓度分别为 0(对照组)、200、400、800、1 600、3 200 mg/L;Sr $^{2+}$ 液体培养基中 Sr $^{2+}$ 浓度分别为 0(对照组)、10、50、100、200、400、800、1 600 mg/L。每组设置 3 个平行样。

磷酸酶活性、活性氧含量测量试验组中各浓度梯度:Co $^{2+}$ 液体培养基中 Co $^{2+}$ 浓度分别为 0(对照组)、1、2、4、6、8、10 mg/L;Cs $^{+}$ 液体培养基中 Cs $^{+}$ 浓度分别为 0(对照组)、200、400、800、1 600、3 200 mg/L;Sr $^{2+}$ 液体培养基中 Sr $^{2+}$ 浓度分别为 0(对照组)、10、50、100、150、200、250 mg/L。每组设置 3 个平行样。

1.5.2 大肠杆菌生长曲线绘制 从细菌平板上挑选长势良好的细菌接种至 100 mL R2A 液体培养基中,恒温水浴(37 $^{\circ}$ C)振荡培养 24 h,复苏细菌待用。

按照 1:100 的接种比例,从已复苏的菌液中吸取 1 mL 接入盛有 100 mL 各浓度梯度 Co $^{2+}$ 液体培养基的三角瓶中,振荡混合均匀后分装至具塞试管,每试管分装 5 mL,封口,置于 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴振荡培养。每隔 1 h 左右取出 1 组试管,测量其在 600 nm 波长下的吸光度。氯化铯、氯化铯试验组除培养基配制不同外其余操作相同。

1.5.3 MTT 法检测大肠杆菌在 3 种核素影响下的存活率 噻唑蓝[3-3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide,简称 MTT]法是常用于检测细胞存活的一种方法,其原理是活细胞中琥珀酸脱氢酶能够还原外源性 MTT 为不溶于水的蓝色晶体甲瓖(formazan),通过二甲亚砜溶解甲瓖,测量溶液在特定波长下的吸光度,间接反映细胞存活数量。

称取 250 mg MTT 溶于 50 mL PBS 缓冲溶液(0.01 mol/L,pH=7.2),振荡使其充分溶解,使用微孔过滤器除菌,铝箔包好放置于-20 $^{\circ}$ C 下冷冻待用。按照浓度梯度设置配制氯化钴液体培养基并接种活化的大肠杆菌,水浴振荡培养 4 h。

孵育培养 4 h 后于试管中吸取 1 mL 菌液至 1.5 mL EP 管中,加入 200 μ L 5 mg/mL MTT 溶液,振荡摇匀,避光放置于 37 $^{\circ}$ C 生化培养箱中,继续孵育 1 h。

孵育完成后取出 EP 管,放入高速冷冻离心机 12 000 g 离心 10 min,小心吸去上清液,加入 1 mL 二甲亚砜溶液,振荡摇匀后将混合液铺至 96 孔板,每孔 200 微升并设置复孔,酶标仪检测 510 nm 以及 690 nm 波长下的吸光度。Co $^{2+}$ 、Sr $^{2+}$ 、Cs $^{+}$ 试验组操作除培养基配制外均相同。

1.5.4 大肠杆菌在 3 种核素影响下的碱式磷酸酶活性测量

按照浓度梯度要求配制 100 mL R2A 液体培养基,同时接种 1 mL 新鲜菌液至培养基中,水浴振荡孵育 4 h。完成孵育培养后取菌液于 12 000 g 加速度条件下离心 10 min,并按照碱性磷酸酶试剂盒说明书要求,取 0.05 mL 样本加入 0.5 mL PBS 缓冲液,37 $^{\circ}$ C 水浴振荡 15 min,加入显色剂 1.5 mL,并在 520 nm 条件下进行吸光度测量,通过公式转换得到碱性磷酸酶活性。每组试验重复 3 次。

1.5.5 大肠杆菌在 3 种核素影响下的活性氧含量测量 按照“1.5.4”节中方法制取不同试验样本并离心取菌体,在加速度为 12 000 g 的条件下离心样本 10 min,小心吸去上清液并用生理盐水充分洗涤细菌菌体,按照活性氧(ROS)试剂盒说明书要求,测试其活性氧含量。加入 DCFH-DA(2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐)于上述菌体中,并保证工作浓度为 10 μ mol/L,37 $^{\circ}$ C 孵育细胞 30 min,12 000 g 离心 10 min,收集细菌菌体,并用 PBS 缓冲液洗涤 2 次,在次离心收集菌体用于荧光检测。设置激发波长为 550 nm,发射波长为 525 nm,用于荧光强度检测,每组试验重复 3 次。

1.5.6 大肠杆菌在 3 种核素影响下的蛋白质含量测量 按照“1.5.4”节中方法制取不同试验样本。12 000 g 离心 10 min,生理盐水充分洗涤,取菌体溶于 1 mL 细菌裂解液。按照总蛋白定量试剂盒要求方法测定样本中总蛋白的含量。

2 结果与分析

2.1 3种核素胁迫作用对大肠杆菌生长速率的影响

由图1可知,孵育2 h内大肠杆菌在新的培养环境中处于适应期,其生长速度较为缓慢,随后的7 h内处于生长对数期。在接触培养前期,10 mg/L的 Cs^+ 浓度对大肠杆菌损伤作用较小,但随着接触培养时间的延长,10 mg/L试验组中的生长曲线与对照组的差异逐渐增大,说明 Cs^+ 对大肠杆菌生长的影响作用会随接触时间的延长逐渐增强。在培养5 h后,10、100 mg/L试验组的吸光度与对照组相比分别下降了8%、11%,而1 000、2 000 mg/L试验组与对照组相比分别下降了31%、45%。可以看出, Cs^+ 对大肠杆菌生长主要表现为抑制作用,且随着剂量的增加,抑制作用逐渐增强;随着培养接触时间延长,其抑制作用也在逐渐增强。

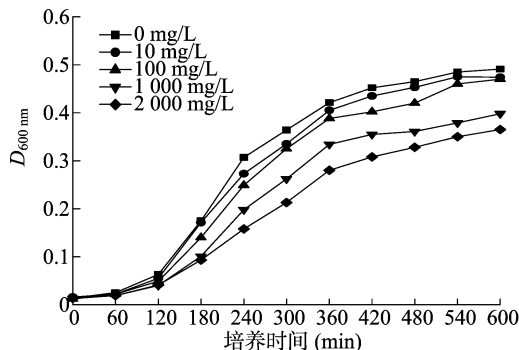
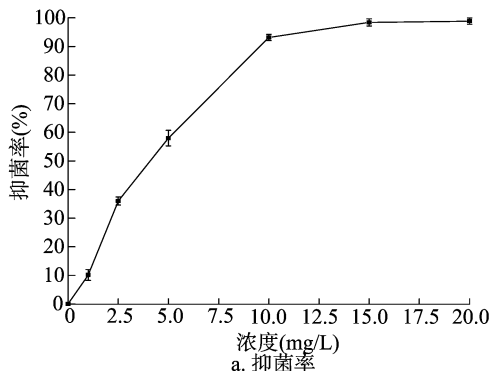


图1 不同 Cs^+ 浓度下大肠杆菌的生长曲线

由图2可知, Sr^{2+} 对大肠杆菌的作用具有双向性,主要表现在低浓度(10 mg/L) Sr^{2+} 下,大肠杆菌的生长比较迅速并且超过对照组,而随着 Sr^{2+} 浓度的增加,浓度大于等于100 mg/L后,大肠杆菌生长变缓、数量越来越少。培养4 h后,与对照组相比,100 mg/L Sr^{2+} 浓度的培养基中,大肠杆菌菌液 $D_{600\text{ nm}}$ 值下降25%,1 000 mg/L Sr^{2+} 浓度试验组 $D_{600\text{ nm}}$ 值下降42%。可以看出,与 Cs^+ 培养条件相比,添加 Sr^{2+} 培养基中大肠杆菌的生长更缓慢;同时,在1 000、2 000 mg/L高浓度试验组中大肠杆菌出现了提前进入衰亡期的现象,即接触反应7 h后,低浓度试验组的大肠杆菌还处于对数期,而高浓度试验组大肠杆菌已经进入衰亡期。



a. 抑菌率

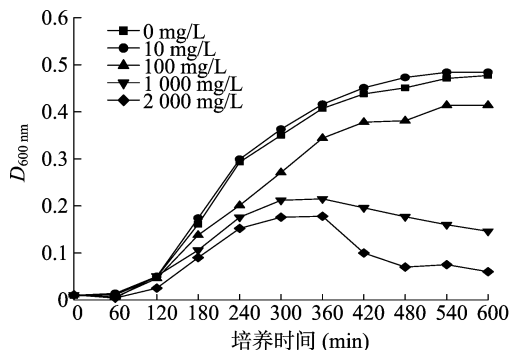


图2 不同 Sr^{2+} 浓度下大肠杆菌的生长曲线

由图3可知,5 mg/L Co^{2+} 对大肠杆菌的生长产生了明显影响,其生长数量明显低于对照组,且20、40 mg/L试验组中大肠杆菌几乎无法生长。在培养5 h后,与对照组相比,5、10 mg/L试验组中大肠杆菌 $D_{600\text{ nm}}$ 值分别下降58%、91%,高浓度 Co^{2+} (>20 mg/L)培养条件下大肠杆菌基本无法生长。

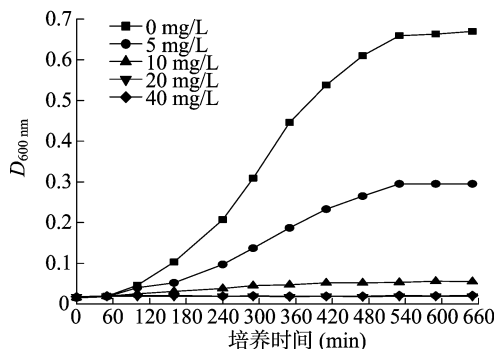
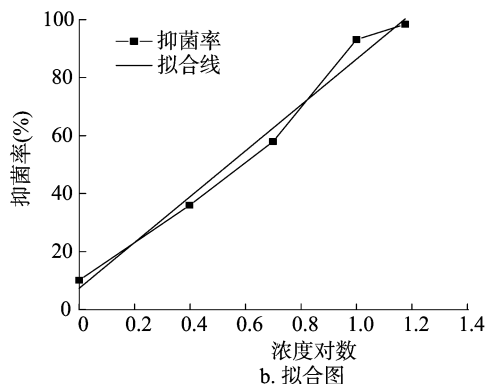


图3 不同 Co^{2+} 浓度下大肠杆菌的生长曲线

2.2 MTT法检测3种核素离子对大肠杆菌毒性

2.2.1 不同浓度 Co^{2+} 对大肠杆菌生长情况的影响 由图4可知,在 Co^{2+} 浓度为10 mg/L时大肠杆菌的死亡率已经达到93.2%,而当 Co^{2+} 浓度增加至20 mg/L时可以使98%以上的大肠杆菌死亡。对浓度取对数,绘制大肠杆菌生长抑制效应曲线,并通过直线拟合发现 Co^{2+} 浓度与大肠杆菌生长抑制率呈现高度的线性关系,通过浓度拟合直线可以估算出 Co^{2+} 对大肠杆菌的半致死效应剂量约为3.38 mg/L。

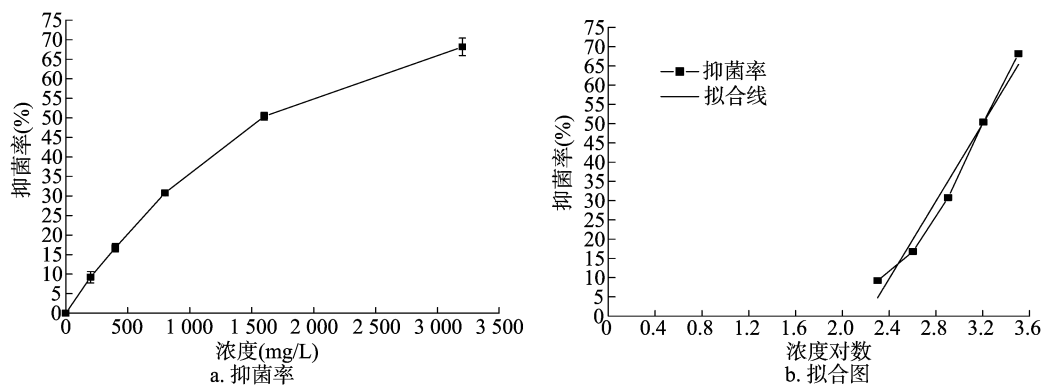


b. 拟合图

图4 Co^{2+} 对大肠杆菌抑菌率(a)以及浓度取对数后的拟合图(b)

2.2.2 不同浓度 Cs^+ 对大肠杆菌生长情况的影响 如图5所示,随着 Cs^+ 浓度增高大肠杆菌的存活率逐渐减小。观察曲线发现当 Cs^+ 浓度在1 500 mg/L以下时,随着 Cs^+ 浓度升

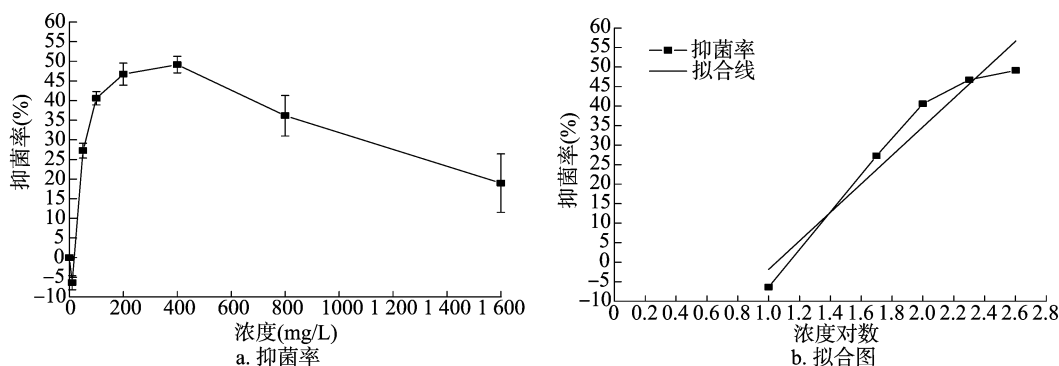
高大肠杆菌的死亡率迅速增大,但当 Cs^+ 浓度高于1 500 mg/L后,大肠杆菌死亡率的增长逐渐趋于平缓。对浓度取对数,使其为横坐标,绘制 Cs^+ 的抑菌效应曲线,拟合可

图5 Cs^+ 对大肠杆菌抑菌率(a)以及浓度取对数拟合图(b)

得到 Cs^+ 对大肠杆菌的半致死率浓度约为 1 600 mg/L。

2.2.3 不同浓度 Sr^{2+} 对大肠杆菌生长情况的影响 由图 6 可知,在 10 mg/L Sr^{2+} 浓度剂量下,大肠杆菌的死亡率为负值,说明其生长状况优于对照组。而随着 Sr^{2+} 浓度继续提高,大肠杆菌的存活率逐渐减小,取浓度对数为横坐标绘制抑制曲线,通过直线拟合可以发现,当 Sr^{2+} 浓度为 13 mg/L 时, Sr^{2+} 对大肠杆菌生长情况与对照组基本持平,其生长情况与对照组相同,随着 Sr^{2+} 浓度的增加,大肠杆菌的生长受到明显抑制,当 Sr^{2+} 浓度达到 100 mg/L 时,大肠杆菌生长抑制率为 40%。当 Sr^{2+} 浓度超过 200 mg/L 后,随着 Sr^{2+} 浓度提高大肠

杆菌生长抑制率的增幅逐渐减缓,当浓度达到 400 mg/L 时抑制作用达到最大,随后抑制作用存在但随着剂量的增大而开始减小。取浓度对数为横坐标,对 Sr^{2+} 浓度为 0 ~ 400 mg/L 时的大肠杆菌生长抑制率进行拟合,可估算 Sr^{2+} 对大肠杆菌生长半致死量约为 251 mg/L。在试验阶段发现,当 Sr^{2+} 浓度超过 400 mg/L 后,培养液中出现了肉眼可见的浑浊,并且随着氯化锶配制浓度的增加,浑浊度呈现增加的趋势。这可能是由于培养基中的营养物质与 Sr^{2+} 形成部分沉淀,降低了溶液中游离态 Sr^{2+} 的存在,削弱了氯化锶对大肠杆菌的毒害作用。

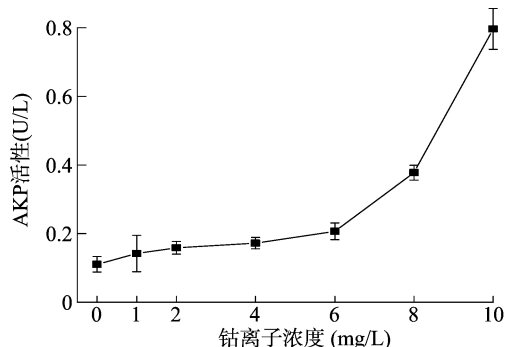
图6 Sr^{2+} 对大肠杆菌抑菌率(a)以及浓度取对数拟合图(b)

2.3 3 种核素离子对大肠杆菌碱性磷酸酶活性的影响

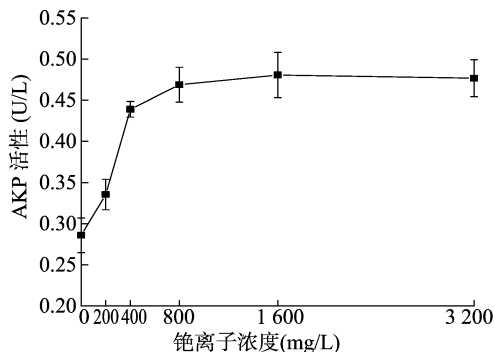
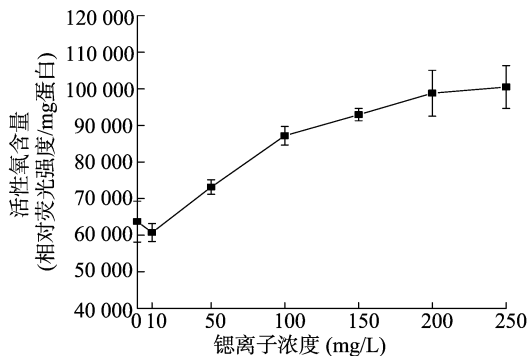
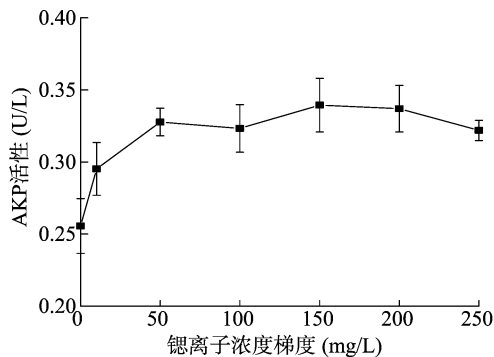
由图 7 可知,在 1、2、4 mg/L Co^{2+} 浓度处理下,大肠杆菌胞外菌液中的碱式磷酸酶活性稍有增强,由 0.11 U/L 增加到 0.17 U/L,增幅约 50%。随着 Co^{2+} 浓度从 4 mg/L 增大至 10 mg/L,大肠杆菌胞外碱式磷酸酶活性由 0.17 U/L 增大至 0.79 U/L,酶活性提高约 4 倍。由图 8 可知,在 0 ~ 800 mg/L Cs^+ 浓度下,大肠杆菌胞外碱式磷酸酶活性也出现提升,其活力由 0.29 U/L 上升至 0.47 U/L,但当 Cs^+ 浓度大于 800 mg/L 时,其胞外碱式磷酸酶活力基本不变。 Sr^{2+} 对大肠杆菌胞外碱式磷酸酶活性的影响较小,在 0 ~ 50 mg/L Sr^{2+} 浓度范围内,大肠杆菌胞外碱式磷酸酶活性由 0.26 U/L 上升到 0.33 U/L,随后随着 Sr^{2+} 浓度的升高,其胞外碱式磷酸酶活性小幅波动,平均保持在 0.33 U/L 左右(图 9)。

2.4 3 种核素离子对大肠杆菌菌体活性氧含量的影响

图 10 显示,在 Co^{2+} 的作用下,大肠杆菌菌体活性氧含量随着 Co^{2+} 浓度升高呈现先缓慢增高后缓慢减弱的趋势,与对照组相比,其相对荧光强度没有明显变化。而在 Cs^+ 、 Sr^{2+} 的

图7 Co^{2+} 处理对大肠杆菌中 AKP 活性影响

影响下,随着金属离子浓度的增加,大肠杆菌活性氧含量快速上升。由图 11 可知,与对照组相比,400 mg/L Cs^+ 浓度下,活性氧含量升高 9.7%,1 600 mg/L Cs^+ 浓度下活性氧含量升高 74%,结合大肠杆菌在 Cs^+ 培养基中的存活率可以看出, Cs^+ 的抑菌效应与活性氧含量可能存在正相关关系。由图 12 可知,与对照组相比,10 mg/L Sr^{2+} 浓度下,活性氧含量相对减

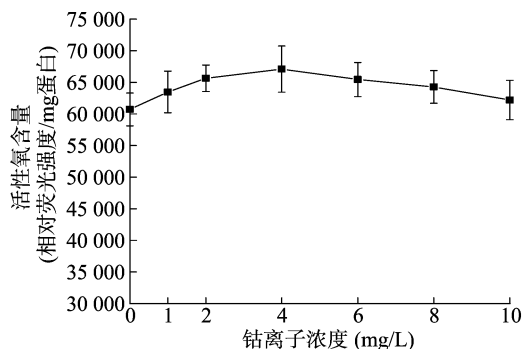
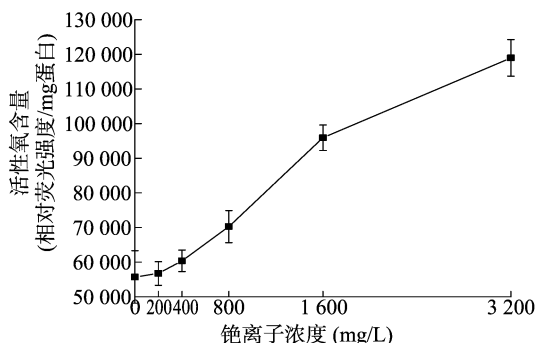
图8 Cs⁺处理对大肠杆菌中 AKP 活性影响图12 Sr²⁺处理对大肠杆菌中活性氧含量影响图9 Sr²⁺处理对大肠杆菌中 AKP 活性影响

3 讨论与结论

目前在环境污染生物监测方向,主要监测污染物为 Pb²⁺、Ag⁺、Hg⁺、Cd²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺,相关研究表明急性毒性由强到弱依次为 Cd²⁺ > Cu²⁺ > Zn²⁺ [12]。本试验以核电站的泄漏污染检测为出发点,主要研究 Co²⁺、Cs⁺、Sr²⁺ 3 种稳定核素对大肠杆菌的影响,后续通过 MTT 法定量研究了大肠杆菌在 3 种核素下的抑制效应,反映了 Co²⁺、Cs⁺、Sr²⁺ 3 种核电站常见污染物对环境的毒性。

研究发现,Co²⁺的毒性最强,在浓度为 10 mg/L 即可对大肠杆菌造成明显的毒害作用,能够抑制 90% 以上细菌生长,徐芳芳的研究表明 Co²⁺ 浓度在 11 mg/L 时已经具有明显的抑菌作用 [13],本试验结果与之相符。而 Cs⁺ 的毒性最小,Sr²⁺ 则表现出了双向性,在 10 mg/L 浓度下对大肠杆菌的生长表现了促进作用,随着浓度增高,促进作用削弱抑制作用增强,在 400 mg/L 时抑制作用最大,为 48%。近年来有许多关于 Sr²⁺ 对植物生长影响的报道,大多数研究成果表明,低浓度的 Sr²⁺ 促进植物生长而高浓度的锶抑制植物生长 [14-15],本试验中锶对大肠杆菌生长作用与之类似。Cs⁺ 比 Sr²⁺、Co²⁺ 对大肠杆菌的毒性稍小,500 mg/L Cs⁺ 对大肠杆菌生长抑制率低于 20%。董新姣等通过最小抑菌浓度反映重金属对大肠杆菌的毒性,发现 Hg⁺ (1 mg/L) > Cd²⁺ (50 mg/L), Pb²⁺ (50 mg/L) > Cu²⁺ (100 mg/L) > Zn²⁺ (200 mg/L) [16]。由此可以得出,Co²⁺ 对大肠杆菌毒性较强,介于 Hg⁺ 与 Pb²⁺ 之间,而 Sr²⁺、Cs⁺ 毒性较小。

金属离子对细菌的毒害表现为多方面联合作用。Avery 等研究发现,Sr²⁺ 能够改变酵母菌的细胞壁通透性 [17]。细菌细胞壁具有抑制机械和渗透损伤的作用,能够保持细胞外形,阻止大分子入侵。碱性磷酸酶主要存在于细菌的细胞壁与细胞膜之间,正常情况下细菌的培养液中检测不到碱性磷酸酶的存在 [18-19]。侯伟峰等通过测定菌液碱性磷酸酶活性,结合电导率的测定反映了植酸对大肠杆菌细胞壁的损坏情况 [20]。Sun 等研究结果证实,Al³⁺ 的胁迫作用能改变植物细胞壁的通透性,致使磷酸酶外泄 [21]。碳酸盐矿物中的阳离子主要包括钙、镁、铁、铜等元素。陈武研究表明,碳酸盐矿物与大肠杆菌作用后碱性磷酸酶大量溢出,并通过电镜扫描证明了这种碱性磷酸酶的溢出源自于大肠杆菌细胞壁被破坏后通透性增大导致 [22]。本试验中,在 Co²⁺ 作用下,大肠杆菌胞外碱性磷酸酶活性随着 Co²⁺ 浓度增加迅速上升,表明 Co²⁺ 对大肠杆菌

图10 Co²⁺处理对大肠杆菌中活性氧含量影响图11 Cs⁺处理对大肠杆菌中活性氧含量影响

少 4.7%,随后增加 Sr²⁺ 浓度,活性氧含量随之上升;其中,与对照组相比,50 mg/L 试验组中活性氧含量上升 14.7%,200 mg/L 试验组中活性氧含量上升 55.1%,此时继续增加 Sr²⁺ 浓度,活性氧含量的增加量基本趋于平缓,与大肠杆菌在 Sr²⁺ 作用下的存活率可能存在一定的正相关关系。

的细胞壁具有破坏作用,使得大肠杆菌的细胞壁通透性增加,继而在胞外出现大量 AKP。可以推测 Co^{2+} 对大肠杆菌的至毒机理可能是破坏细胞壁完整性,使细菌内环境的稳定性受到破坏,从而抑制细菌生长。 Cs^+ 、 Sr^{2+} 试验组中大肠杆菌胞外碱式磷酸酶活性变化不大,其抑菌作用与细胞壁的通透性完整性变化相关性不大。

金属离子对微生物的毒性还体现在氧化损伤层面,研究表明金属离子会诱导活性氧的产生,通过线粒体呼吸链引起细胞氧化应激,导致氧化损伤^[23]。金属离子也能抑制抗氧化酶系统,从而对细胞造成不可逆的损伤^[24]。冯德玉等在油菜对镉胁迫的生理生态响应中发现, Sr^{2+} 对细胞同样具有氧化损伤作用,在 Sr^{2+} 胁迫作用下其氧化损伤作用增强,POD 酶和 SOD 酶等抗氧化系统酶活性都出现了增高的现象^[25]。本试验中在 Co^{2+} 试验组中发现各组样本中活性氧含量随着 Co^{2+} 浓度上升出现了先升后降的现象,但其变化幅度均在 10% 之内。而 Cs^+ 、 Sr^{2+} 试验组中活性氧含量检测结果表明,外源添加的 Cs^+ 和 Sr^{2+} 这 2 种金属离子明显提高了大肠杆菌菌体内部活性氧含量,结合 2 种离子培养下的抑菌率可以推测 Cs^+ 与 Sr^{2+} 对大肠杆菌的致毒效应与其活性氧含量的积累有关。

本试验结果表明, Co^{2+} 对大肠杆菌半致死浓度约为 3.38 mg/L, Sr^{2+} 对大肠杆菌半致死浓度约为 251 mg/L, Cs^+ 对大肠杆菌半致死浓度约为 1 600 mg/L。 Sr^{2+} 对大肠杆菌生长影响表现了双向性,即低浓度(小于 10 mg/L)是表现为刺激生长,而高浓度下表现为抑制生长。 Co^{2+} 的胁迫作用使大肠杆菌菌壁膜通透性发生改变造成碱性磷酸酶出现大量泄漏,表明 Co^{2+} 毒性机理与其改变细胞壁膜通透性有关。 Cs^+ 与 Sr^{2+} 的毒性与氧化损伤有关,离子诱导胞内活性氧的积累,达到了抑菌作用。

参考文献:

- [1] Zhu Y G, Shaw G. Soil contamination with radionuclides and potential remediation[J]. Chemosphere, 2000, 41(1/2): 121–128.
- [2] Beresford N A, Hosseini A, Brown J E, et al. Assessment of risk to wildlife from ionising radiation; can initial screening tiers be used with a high level of confidence[J]. Journal of Radiological Protection, 2010, 30(2): 265–281.
- [3] 俞誉福. 环境放射性概论[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1993.
- [4] 唐永金, 罗学刚. 植物吸收和富集核素的研究方法[J]. 核农学报, 2011, 25(6): 1292–1299.
- [5] Vandenhove H, Sweeck L, Batlle J V I, et al. Predicting the environmental risks of radioactive discharges from Belgian nuclear power plants[J]. Journal of Environmental Radioactivity, 2013, 126(4): 61–67.
- [6] Larsson C M. An overview of the ERICA integrated approach to the assessment and management of environmental risks from ionising contaminants[J]. Journal of Environmental Radioactivity, 2008, 99(9): 1364–1370.
- [7] Copplestone D, Beresford N A, Brown J E, et al. An international database of radionuclide concentration ratios for wildlife: development and uses[J]. Journal of Environmental Radioactivity, 2013, 126: 288–298.
- [8] Azarbad H, Niklińska M, van Gestel C A, et al. Microbial community structure and functioning along metal pollution gradients[J]. Environmental Toxicology & Chemistry, 2013, 32(9): 1992–2002.
- [9] Ibekwe A M, Grieve C M. Changes in developing plant microbial community structure as affected by contaminated water[J]. Fems Microbiology Ecology, 2004, 48(2): 239–248.
- [10] 汪志荣, 高琼, 马传鑫, 等. MTT 法测定大肠杆菌活菌数实验研究[J]. 环境科学学报, 2011, 31(12): 2642–2650.
- [11] 谢海. 不同伴随阴离子对铅染毒蚕豆根细胞质膜 Ca^{2+} - ATPase 活性的影响[D]. 成都: 四川师范大学, 2006.
- [12] 吕艳春. 铜、锌和镉对大肠杆菌的生长抑制急性毒性效应研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2010.
- [13] 徐芳芳. 柔性金属对大肠杆菌毒性机理的研究[D]. 上海: 东华大学, 2012.
- [14] 敖嘉, 唐运来, 陈梅, 等. Sr 胁迫对油菜幼苗抗氧化指标影响的研究[J]. 核农学报, 2010, 24(1): 166–170.
- [15] Choi Y H, Kang H S, Jun I, et al. Transfer of ^{90}Sr to rice plants after its acute deposition onto flooded paddy soils[J]. Journal of Environmental Radioactivity, 2007, 93(3): 157–169.
- [16] 董新姣, 张锋, 徐向勇. 重金属对大肠杆菌的毒性研究[J]. 杭州师范学院学报, 2000(3): 60–62.
- [17] Avery S V, Smith S L, Ghazi A M, et al. Stimulation of strontium accumulation in linoleate-enriched *Saccharomyces cerevisiae* is a result of reduced Sr^{2+} efflux[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1999, 65(3): 1191–1197.
- [18] 宋剑武, 吴永继, 孙燕杰, 等. 救必应水提取物对产 ESBLs 细菌的抑菌机理研究[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(6): 1536–1543.
- [19] 石超峰, 殷中琼, 魏琴, 等. α -松油醇对大肠杆菌的抑菌作用及其机理研究[J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(5): 796–801.
- [20] 侯伟峰, 谢晶, 蓝蔚青, 等. 植酸对大肠杆菌抑菌机理的研究[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(2): 443–447.
- [21] Sun Q B, Shen R F, Zhao X Q, et al. Phosphorus enhances Al resistance in Al-resistant *Lespedeza bicolor* but not in Al-sensitive *L. cuneata* under relatively high Al stress[J]. Annals of Botany, 2008, 102(5): 795–804.
- [22] 陈武. 中国西北地区几种尘类矿物与微生物界膜电性特征研究[D]. 绵阳: 西南科技大学, 2014.
- [23] Wataha J C, Lewis J B, Lockwood P E, et al. Effect of dental metal ions on glutathione levels in THP human monocytes[J]. Journal of Oral Rehabilitation, 2000, 27(6): 508–516.
- [24] Nehru B, Dua R. The effect of dietary selenium on lead neurotoxicity[J]. Journal of Environmental Pathology Toxicology & Oncology: Official Organ of the International Society for Environmental Toxicology & Cancer, 1997, 16(1): 47–50.
- [25] 冯德玉, 代其林, 崔广艳, 等. 油菜对 Sr 胁迫的生理生态响应[J]. 植物学研究, 2013, 2(5): 125–129.