

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20170504001

赖健, 安达, 王月, 等. 纳米零价铁的微生物毒性效应研究进展[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(4): 129-137

Lai J, An D, Wang Y, et al. Research advances on microbial toxic effects of nanoscale zero-valent iron [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(4): 129-137 (in Chinese)

## 纳米零价铁的微生物毒性效应研究进展

赖健<sup>1,2</sup>, 安达<sup>2\*</sup>, 王月<sup>2</sup>, 李娟<sup>2</sup>, 席北斗<sup>2</sup>, 吴明红<sup>1</sup>, 周炼<sup>2,3</sup>, 涂婷<sup>2,3</sup>, 张士宽<sup>2,4</sup>

1. 上海大学环境与化学工程学院, 上海 200444

2. 中国环境科学研究院, 国家环境保护地下水污染过程模拟与控制重点实验室, 北京 100012

3. 重庆交通大学, 重庆 400074

4. 中国矿业大学(北京) 地球科学与测绘工程学院, 北京 100083

收稿日期: 2017-05-04 录用日期: 2017-08-15

**摘要:** 纳米零价铁(nanoscale zero-valent iron, NZVI)是一种新型的地下水修复材料, NZVI的生物安全性研究已经引起了世界各国学者的广泛关注。本文综述了国内外有关NZVI微生物毒性的研究成果, 重点介绍了NZVI对微生物的毒性效应及致毒机理, 归纳总结了影响NZVI颗粒毒性效应的各种因素, 并对未来NZVI材料毒性研究的发展方向进行了展望, 以期对NZVI的生物安全性研究提供参考。

**关键词:** 纳米零价铁; 生物安全性; 毒性效应; 致毒机理

文章编号: 1673-5897(2017)4-129-09 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## Research Advances on Microbial Toxic Effects of Nanoscale Zero-Valent Iron

Lai Jian<sup>1,2</sup>, An Da<sup>2\*</sup>, Wang Yue<sup>2</sup>, Li Juan<sup>2</sup>, Xi Beidou<sup>2</sup>, Wu Minghong<sup>1</sup>, Zhou Lian<sup>2,3</sup>, Tu Ting<sup>2,3</sup>, Zhang Shikuan<sup>2,4</sup>

1. School of Environmental and Chemical Engineering, Shanghai University, Shanghai 200444, China

2. State Environmental Protection Key Laboratory of Simulation and Control of Groundwater Pollution, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China

3. Chongqing Jiaotong University, Chongqing 400074, China

4. College of Geoscience and Surveying Engineering, China University of Mining and Technology, Beijing 100083, China

Received 4 May 2017 accepted 15 August 2017

**Abstract:** Nanoscale zero-valent iron (NZVI) as a kind of emerging remedial material is used for contaminated groundwater. Its biological safety has received great concerns in recent years. In the study, the previous research results on the microbial toxicity of NZVI were summarized. The effect and mechanism of microbial toxicity of NZVI was discussed and analyzed, and major factors influencing the toxicity of NZVI nanoparticle were illuminated. The research prospect on the toxicity of NZVI nanoparticle was put forward so as to provide theoretical support for the research work on biological safety of NZVI.

**Keywords:** nanoscale zero-valent iron; biological safety; toxic effect; toxicity mechanism

基金项目: 2017年全国地下水基础环境状况调查评估项目(144130012110302)

作者简介: 赖健(1992-), 男, 浙江建德人, 硕士研究生, 研究方向为地下水风险评估, E-mail: jianlai201509@163.com

\* 通讯作者( Corresponding author ), E-mail: anda@craes.org.cn

纳米零价铁(nanoscale zero-valent iron, NZVI)是指粒径在 1~100 nm 的零价铁颗粒,它具有廉价、易操作、能够快速有效地去除卤化物<sup>[1]</sup>、硝酸盐<sup>[2]</sup>、多环芳烃<sup>[3-5]</sup>和重金属<sup>[6-8]</sup>等多种污染物等优点。在 20 世纪 90 年代,国际上就已经开展有关应用 NZVI 治理重金属及含氯污染物的研究,目前 NZVI 已成为运用于地下水污染场地修复最为广泛的纳米材料。在地下水原位修复中人工合成的 NZVI 越来越多地应用势必会造成大量的 NZVI 颗粒释放到地下水环境中,考虑到 NZVI 独特的物理化学特性,其对生态环境的影响目前尚不清楚,应该对其生态环境风险给予客观完整评估<sup>[9-12]</sup>。

微生物作为许多基本生态系统进程的关键参与者将首先暴露于 NZVI 颗粒环境中,因此,为了解决 NZVI 颗粒与生态系统长期共存带来的问题,首先需要彻底评估 NZVI 对本土微生物的影响<sup>[13-14]</sup>。在近 10 年来,毒性研究表明, NZVI 可以对微生物物种施加一定程度的毒性,而且相关研究和报道进一步阐明 NZVI 对细胞和群落水平的影响。因此,本文综合概括了国内外近 10 年关于 NZVI 的微生物毒性效应、致毒机制及影响因素等方面的研究现状,指出目前 NZVI 毒性研究还存在的问题,并对今后亟待深入研究的方向进行了展望。

## 1 NZVI 对微生物的毒性效应 (Toxic effect of NZVI on microorganisms)

常见的 NZVI 是一种人工合成的新型材料,目前对其的关注多集中在污水处理和地下水修复技术的方面,但是 NZVI 暴露带来的人类健康和生态环境的潜在影响也值得我们来探究研讨。Service<sup>[15]</sup>和 Brumfiel<sup>[16]</sup>也发表过同类观点,强调必须警惕纳米材料的生物效应以及安全性问题。2005 年,由纳米材料的毒性效应研究衍生出纳米科学的一个新的分支——纳米毒理学:这一分支的研究领域主要研究纳米材料与生物体系,包括组织、器官、细胞、亚细胞结构以及生物大分子的相互作用及其引起的毒性效应<sup>[17]</sup>。微生物在生态环境中具有非常重要的作用,微生物作为土壤中的活性组分,不仅调节着有机质分解、养分循环和能量转换,而且对微环境变化比较灵敏,其微生物活性和群落结构变化能敏感指示土壤质量和健康状况<sup>[18]</sup>。微生物在生态系统功能和生产力中起关键作用, NZVI 对微生物的毒性已受到广泛的关注<sup>[19-20]</sup>。通过研究微生物与 NZVI 颗粒之间的相互作用,可以更好地了解 NZVI 颗粒对生态

环境的影响。在过去 10 年中,越来越多的研究评估了 NZVI 对微生物物种的毒性(表 1)。

由此可见, NZVI 的微生物毒性效应研究已引起广泛的关注。目前,主要通过各种微生物菌种暴露于 NZVI 不同条件下的细胞活力、细胞生长和细胞完整性来研究 NZVI 对微生物的毒性效应。已有研究表明 NZVI 会不同程度地影响细胞、亚细胞和蛋白质的生理活性,甚至会造成细胞的死亡<sup>[21-24]</sup>。Chai-thawiwat 等<sup>[21]</sup>研究大肠杆菌在 10~70 nm 粒径、1 000 mg·L<sup>-1</sup>的 NZVI 染毒后的毒性,结果表明大肠杆菌在指数生长期和衰亡期期间 NZVI 毒性更严重,且毒性效应是应变依赖性的。Chen 等<sup>[29]</sup>研究得出 20~30 nm 粒径、5 000 mg·L<sup>-1</sup>的 NZVI 涡流暴露 5 min 会有 80% 大肠杆菌失活。Lee 等<sup>[23]</sup>在有氧和无氧的条件下进行 NZVI 毒性研究,结果显示 NZVI 会对大肠杆菌造成明显的细胞损伤,且相对于有氧情况下,在厌氧条件下表现出更严重的毒性; Kim 等<sup>[24]</sup>得出相类似的结果,并认为 NZVI 会破坏大肠杆菌细胞膜。虽然有研究表明 NZVI 对植物克雷伯氏菌没有任何的毒性作用<sup>[26]</sup>,但大多数研究发现 NZVI 对其他微生物细胞如枯草芽孢杆菌<sup>[28]</sup>、大肠杆菌<sup>[21-24]</sup>、荧光或恶臭假单胞菌<sup>[21, 27]</sup>以及鞘氨醇单胞菌<sup>[7]</sup>的活力和活性、细胞完整性以及微生物生长具有明显的负面作用,表明 NZVI 对于多种微生物具有一定的负面影响。

目前, NZVI 颗粒通常通过对表面涂层进行改性来改善其在地下水修复应用中的稳定性,然而 NZVI 的改性可能不仅影响颗粒的稳定性,而且还影响颗粒的细胞毒性<sup>[30-31]</sup>。例如, Dong 等<sup>[30]</sup>通过羧甲基纤维素(CMC)改性 NZVI(CNZVI)对大肠杆菌细胞毒性研究发现 CMC 能够极大地抑制 NZVI 对大肠杆菌的毒性,且 TEM 分析表明大肠杆菌暴露于 NZVI 后纳米颗粒会发生膜破坏和细胞内化,而在 CNZVI 条件下外膜附近的纳米颗粒层能够附着在细菌细胞壁且细胞膜保持完整。Li 等<sup>[31]</sup>研究 NZVI 对大肠杆菌的毒性效应得出相类似的结果,当 NZVI 颗粒表面吸附有机质或者聚合物(聚苯乙烯磺酸盐、聚天冬氨酸)时,大肠杆菌在暴露 60 min 之后,其对大肠杆菌的抑制率会有所降低,从 2.2-log 降低至 0.2-log; 并发现裸露的 NZVI 颗粒能够附着于大肠杆菌表面,而被吸附在 NZVI 上的聚合物或有机质可以有效地阻止 NZVI 颗粒在大肠杆菌表面的附着,这表明可能是由于改性剂阻碍了 NZVI 和受试细胞的接触,从而导致其毒性减弱。

已有大量研究证明了 NZVI 对微生物的毒性作用,但是考虑到地下水环境中存在的复杂的微生物相互作用和环境条件的影响,越来越多的研究来评估 NZVI 对地下水含水层的复杂微生物群落的影响。这些研究结合传统的微生物生态学和分子技术,使用微观实验装置,研究 NZVI 与微生物组分和环境的相互作用<sup>[32-33]</sup>。Kirschling 等<sup>[32]</sup>报道了在 NZVI 加入后 250 d,真菌多样性发生了明显的重大变

化。Kumar 等<sup>[33]</sup>研究表明 NZVI 加入 130 d 后,含水层沉积物的微生物群落结构发生转变,嗜酸氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)仍然存在于对照微观结构中,但是其已不再具有主导地位,随着时间的推移,梭菌(*Clostridium*)和 *Sporotalea propionica* 相关物种逐渐占有主导地位。这些结果表明, NZVI 可能对含水层本土微生物群落结构具有长期影响,未来的研究还需进一步加强 NZVI 对本土微生

表 1 NZVI 对不同微生物的毒性效应

Table 1 Toxic effect of NZVI on microorganisms

菌种种类 Species of bacteria	NZVI 特征 Features of NZVI	毒性效应 Toxicity	文献 References
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	10~70 nm, 1 000 mg·L <sup>-1</sup>	10~70 nm 粒径、1 000 mg·L <sup>-1</sup> 的 NZVI 对大肠杆菌生长具有抑制作用,且大肠杆菌在指数生长期和下降生长期期间更严重的毒性 NZVI with 10-70 nm particle size and 1 000 mg·L <sup>-1</sup> inhibited the growth of <i>Escherichia coli</i> and the more severe toxicity to <i>Escherichia coli</i> during exponential growth and decline	[21]
	(320±30) nm, 7~700 mg·L <sup>-1</sup>	7~700 mg·L <sup>-1</sup> 的 NZVI 染毒大肠杆菌得出 NZVI 浓度大于 70 mg·L <sup>-1</sup> 时 75% 失活 <i>Escherichia coli</i> exposure to 7-700 mg·L <sup>-1</sup> of NZVI; when NZVI concentration greater than 70 mg·L <sup>-1</sup> , 75% inactivation of <i>Escherichia coli</i>	[22]
	10~80 nm, 1.12~110 mg·L <sup>-1</sup>	厌氧条件下表现出严重毒性,而在有氧情况下为轻微的毒性, NZVI 会对大肠杆菌造成明显的细胞损伤 In anaerobic conditions severe toxicity, and in aerobic mild toxicity; NZVI will cause significant cell damage to <i>E. coli</i>	[23-24]
鞘氨醇单胞菌 <i>Sphingomonas sp.</i> <i>PH-07</i>	(33.2±1.2) m <sup>2</sup> ·g <sup>-1</sup> , 500~10 000 mg·L <sup>-1</sup>	NZVI 浓度在 2 500 mg·L <sup>-1</sup> 以下时鞘氨醇单胞菌能够正常生长,但在 5 000 mg·L <sup>-1</sup> 以上不能够生长 <i>Sphingomonas sp. PH-07</i> with a concentration of NZVI below 2 500 mg·L <sup>-1</sup> can grow normally, but can not grow above 5 000 mg·L <sup>-1</sup>	[25]
植生克雷伯菌 <i>Klebsiella planticola</i>	≤50 nm, 7~700 mg·L <sup>-1</sup>	NZVI 对植生克雷伯菌的生长发育能力和活性无明显影响,没有明显的细胞损伤 NZVI had no significant effect on the growth and development ability and activity of <i>Klebsiella planticola</i> , and there was no obvious cell injury	[26]
荧光假单胞菌 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	20~30 nm, 100~10 000 mg·L <sup>-1</sup>	荧光假单胞菌在 100~10 000 mg·L <sup>-1</sup> NZVI 浓度下全都失活,在 TEM(扫描电子显微镜)观察下发现铁沉淀附着在细胞表面 <i>Pseudomonas fluorescens</i> were all inactivated at NZVI concentration of 100-10 000 mg·L <sup>-1</sup> , and iron precipitation was observed on the surface of the cell under TEM (scanning electron microscopy)	[27]
恶臭假单胞菌 <i>Pseudomonas putida</i>	10~70 nm, 1 000 mg·L <sup>-1</sup>	NZVI 对恶臭假单胞菌生长阶段中指数期和衰退期呈现更严重的毒性 NZVI showed more severe toxicity in the exponential and recessive stages of <i>Pseudomonas putida</i>	[21]
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	20~30 nm, 100~10 000 mg·L <sup>-1</sup>	NZVI 对枯草芽孢杆菌具有毒性作用,在 NZVI 浓度在 100、1 000 和 10 000 mg·L <sup>-1</sup> 下分别为 100%、95% 和 80% 灭活 NZVI is toxic to <i>Bacillus subtilis</i> and 100%, 95% and 80% of inactivation in NZVI concentrations of 100, 1 000 and 10 000 mg·L <sup>-1</sup> , respectively	[28]

物群落结构毒性效应方面以及本土功能微生物生态效应和植物等影响因素对 NZVI 毒性影响的研究。

## 2 NZVI 对微生物的致毒机制 (Toxicity mechanism of NZVI to microorganisms)

目前,虽然国内外关于 NZVI 毒性效应的研究已有很多,但是关于 NZVI 的致毒机制尚且没有统一的结论,大多数研究成果表明 NZVI 可能的毒性机制主要包括纳米颗粒进入细胞内部、细胞膜损伤、诱导活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生造成氧化损伤以及  $\text{Fe}^{2+}$  的释放<sup>[6-8,34-39]</sup>(图 1)。

### 2.1 纳米颗粒进入细胞内部

NZVI 是指粒径为 1~100 nm 的铁颗粒<sup>[40]</sup>, NZVI 的粒径大小会影响其活性, NZVI 粒径小的特性可能是其能够造成生物毒性效应的关键因素<sup>[41]</sup>。已有研究者发现在细菌细胞内有纳米颗粒的存在<sup>[42]</sup>, 但 NZVI 颗粒是通过何种方式进入细菌细胞尚不明确。因为细菌作为原核细胞不具有胞饮作用,而且细菌的细胞壁结构不利于 NZVI 颗粒主动进入。NZVI 颗粒进入细胞的可能是在破坏细胞壁破坏后, NZVI 颗粒通过扩散作用进入细胞内部,对细胞进一步造成毒性效应,除 NZVI 颗粒被细胞内化外, NZVI 颗粒对细菌的致毒机理可能与真核细胞类似<sup>[34]</sup>。

### 2.2 细胞膜损伤

已有文献表明, NZVI 产生的  $\text{Fe}^{2+}$  和 ROS 所造成的细胞膜破裂和氧化应激可能是导致 NZVI 毒性的主要机制<sup>[41]</sup>。微生物细胞膜将胞质和其他胞内物质与外界环境隔离开,阻止有害物质进入,维持细胞功能的正常发挥<sup>[18]</sup>。纳米颗粒在细菌表面的吸附可

能堵塞细胞膜运输通道、破坏细胞膜通透性、磨损细胞壁成分;细胞壁被破坏后,纳米颗粒可能进入细胞内部,进一步与细胞内部组分作用<sup>[34]</sup>。NZVI 颗粒可能通过与细胞膜上某些生物大分子发生反应,从而使其正常的生理功能受到影响,甚至干扰细胞膜某些正常的功能。Diao 等<sup>[43]</sup>研究结果表明荧光假单胞菌在 NZVI 浓度 100~10 000  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  下全都失活,在 TEM(扫描电子显微镜)观察下发现 NZVI 颗粒会沉淀附着在细菌细胞表面,可能是由于 NZVI 颗粒与细菌细胞膜上的某些生物大分子发生反应,从而造成荧光假单胞菌的失活。Lee 等<sup>[44]</sup>认为 NZVI 与细菌细胞的直接接触是 NZVI 发挥毒性效应所必需的, NZVI 的强还原能力可能使脂多糖、电子和离子膜转运蛋白变性,损害膜的通透性,并促进毒性  $\text{Fe}^{2+}$  进入细胞。一旦内化,  $\text{Fe}^{2+}$  可以与线粒体中产生的  $\text{H}_2\text{O}_2$  反应(即通过 Fenton 反应),并形成高活性氧物质例如  $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2$  或  $\text{FeO}^{2+}$ , 导致氧化应激及之后细胞的死亡<sup>[22]</sup>。

### 2.3 ROS 的产生造成氧化损伤

目前国内外研究者比较认同的一种 NZVI 的致毒机理是由于诱导 ROS 的产生造成氧化损伤,其在细胞环境中积聚并且使脂质、蛋白质和核酸等大分子物质变性,破坏细胞内结构并最终导致细胞死亡<sup>[36,38-39,45]</sup>。ROS 是指需氧细胞在生长代谢过程中产生的一系列具有高活性的氧或含氧基团<sup>[41]</sup>,包括羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ )、超氧自由基( $\cdot\text{O}_2$ )、脂质过氧化物( $\text{RO}\cdot$ )以及过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )等<sup>[37]</sup>,在生物进化过程中已经形成了包括抗氧化剂和抗氧化酶在内的抗氧化防御系统,能够及时清除细胞体内多余的活性氧,

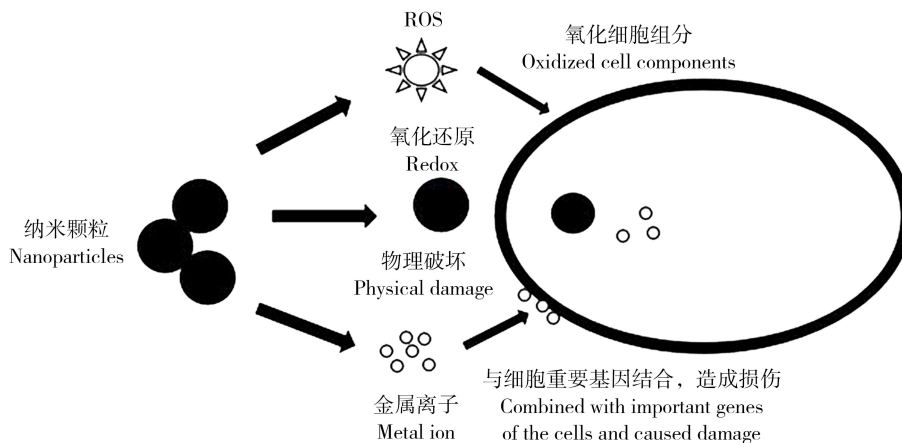
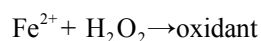
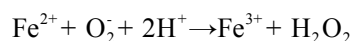
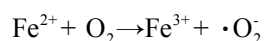
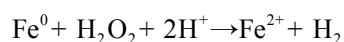
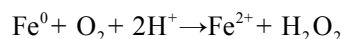
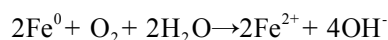


图 1 纳米颗粒对细菌产生毒性的途径<sup>[34]</sup>

Fig. 1 Possible toxic mechanism of oxide nanoparticles to bacteria<sup>[34]</sup>

以此来维持细胞内活性氧的动态平衡<sup>[46]</sup>。正常情况下活性氧对信号传导很重要,当活性氧累积过量时细胞中的酶(过氧化物酶和超氧化物歧化酶)受到激发从而缓解活性氧造成的伤害,但这种抵御作用是有限度的<sup>[18]</sup>,但如果不能够快速清除细胞内积累的ROS,当ROS的量超过细胞自身对其的清除能力,就会发生氧化应激反应,使得细胞内的氧化压力增强,造成细胞的氧化损伤<sup>[47]</sup>。NZVI具有很强的表面活性和还原性,能够在接触生物体内电子供体时产生ROS,而且也会在细胞体内发生以下反应产生大量ROS<sup>[19,44]</sup>:



Nel等<sup>[48]</sup>曾在Science上发论文推测纳米材料造成生物毒性效应的重要原因可能是ROS的生成和机体的氧化应激反应。Auffan等<sup>[22]</sup>通过测定大肠杆菌在NZVI暴露后细胞内超氧化物歧化酶活性的变化,得出氧化应激可以直接由内化的NZVI引起,或者间接通过吸附到细胞上的NZVI释放有毒的 $\text{Fe}^{2+}$ 导致 $\text{Fe}^{2+}$ 的局部增加且通过对受损的细胞膜的渗透造成氧化损伤。Lee等<sup>[21]</sup>有氧和无氧的条件进行NZVI毒性研究,结果是在厌氧条件下表现出严重毒性,而在有氧情况下轻微的毒性,推测NZVI会对大肠杆菌造成明显的细胞损伤是由于在氧气充足条件下, $\text{Fe}^{2+}$ 比在厌氧条件下氧化更快,因此在厌氧条件下 $\text{Fe}^{2+}$ 对NZVI毒性的贡献高于在有氧条件下;Kim等<sup>[24]</sup>也得出相类似的结果。王学等<sup>[49]</sup>通过加入抗氧化剂N-乙酰半胱氨酸(NAC)后NZVI对大肠杆菌的生长曲线和菌落数的影响降低,得出NZVI毒性效应降低,直观地表明了氧化损伤是NZVI的致毒机制。

#### 2.4 铁离子的释放

纳米颗粒具有大比表面积,因此能够在短时间溶解出大量的金属离子<sup>[50]</sup>。一方面溶解出的金属离子能够与细胞壁、细胞膜组分、胞内蛋白或者核酸发生作用,对细胞产生损伤,从而干扰细胞生长代谢的正常运转工作<sup>[34]</sup>;另一方面NZVI材料溶解出的 $\text{Fe}^{2+}$ 离子更容易透过破坏的细胞膜进入细胞内,从而增强NZVI材料对生物体的毒性<sup>[51-52]</sup>。NZVI在

修复污染物时具有一定的溶解性,可以溶出一定量的铁离子,而且NZVI在产生ROS的反应过程中也会有铁离子产生,铁离子是生物的生长代谢过程所必须的成分,但是过量的铁离子可能会对细胞产生毒害作用,或是通过Fenton反应生成ROS造成生物体的氧化损伤。Kim等<sup>[53]</sup>研究得出造成大肠杆菌噬菌体MS2病毒失活的重要原因是NZVI所溶解出的 $\text{Fe}^{2+}$ 。

#### 2.5 DNA损伤

纳米粒子造成DNA损伤是目前研究的一个热点,如果纳米粒子足够小,就可以进入核膜孔,被输进细胞核,与DNA直接相互作用。纳米材料会造成细胞内结构损伤,存活率下降,细胞内氧化自由基水平升高以及DNA断链等毒性反应,致使细胞在一定条件下发生凋亡<sup>[54]</sup>。已有研究表明纳米粒子造成DNA损伤的可能机制就是通过纳米粒子产生自由基。一些金属纳米粒子能够存在于每一个细胞中的过氧化氢相互作用,并将其转化为能够进入细胞核的氢氧自由基,可能会造成DNA损伤。NZVI引起的DNA损伤可能是由于氧化损伤造成的,目前有关于NZVI导致DNA损伤的研究资料还比较少,具体的机制还不明确,这也是NZVI毒性研究需要加强的一个方向。

### 3 影响NZVI微生物毒性的因素 (Factors affecting NZVI bacterial toxicity)

#### 3.1 NZVI的性质

NZVI的毒性效应首先由其本身的性质所决定。对于纳米材料,尤其是颗粒态纳米材料,纳米材料的尺寸大小和团聚状况对其生物可给性的影响非常重要,通常认为小尺寸纳米颗粒比大尺寸纳米颗粒有更高的生物可给性<sup>[55]</sup>。NZVI的颗粒大小可影响其比表面积,纳米材料的粒径与其比表面积成反比,粒径越小,比表面积越大、表面活性越强,且NZVI更容易进入细胞内,并且难以被巨噬细胞清楚,更容易对生物体造成损伤,毒性则就更强<sup>[56]</sup>,在体外毒性实验中,纳米颗粒会被分散于细胞培养基中。此时,颗粒处于水溶液环境,包括粒径等其他特征会发生相应变化,而这些变化很可能会影响到颗粒与生物体的作用方式及强度大小<sup>[54]</sup>。金属纳米颗粒在水溶液中易发生团聚效应,团聚后的颗粒其粒径大小决定了颗粒是通过细胞内吞作用,ROS诱导的吞噬作用还是其他机制进入细胞内部。因此,NZVI的粒径大小是影响其毒性的关键因素之一。此外

Handy 等<sup>[57]</sup>提出 NZVI 的形态可能会影响其毒性,但目前还未见相关报道。

NZVI 的毒性也与其表面特性和表面修饰密切相关。由于 NZVI 比表面积较大、还原性极强,具有较强的团聚性能,在实际应用中很容易被氧化,并且不容易保存和持续应用。因此,各国学者研究了多种表面修饰方法来稳定 NZVI,降低其团聚<sup>[58]</sup>。NZVI 材料可以与细胞接触相互作用产生 ROS 致使细胞失活,NZVI 通过修饰改变其表面性质,从而可能会对其毒性存在一定的影响。Zhou 等<sup>[59]</sup>利用羧甲基纤维素(carboxyl methyl cellulose, CMC)改性 NZVI,分别将土壤杆菌暴露于  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的 CMC-NZVI 和 NZVI,结果表明 1 h 后土壤杆菌分别有 53.2% 和 5.3% 的存活率,其原因可能是 CMC 作为羟基自由基清除剂,能够保护细胞免受氧化应激。然而,Chen 等<sup>[60]</sup>将青鳞鱼的幼体分别暴露于 CMC-NZVI 和 NZVI 的溶液中,结果显示 CMC-NZVI 由于诱导产生更多的活性氧以及  $\text{Fe}^{2+}$  离子,从而导致更高的死亡率,表明出其毒性要强于未经改性的 NZVI。由此可见,NZVI 改性对其毒性效应的影响可能与不同受试生物有关,也可能受改性剂及改性方法的影响。

此外,NZVI 剂量大小和暴露时间也是影响纳米颗粒细胞毒性的重要关键因素。通常来说,纳米材料的浓度越高,与细胞接触的机会越大,毒性也就越强。Kim 等<sup>[41]</sup>发现 NZVI 浓度在  $2\ 500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  以下的鞘氨醇单胞菌能够正常生长,但在  $5\ 000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  以上不能够生长。Le 等<sup>[61]</sup>研究在暴露于  $100$  和  $1\ 000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NZVI 6 h 后细胞活力分别降低 11.4% 和 32%。NZVI 溶解出的铁离子可能对微生物具有潜在毒性,所以 NZVI 颗粒的浓度以及对微生物的暴露时间也其毒性效应具有一定作用。Chen 等<sup>[46]</sup>研究 NZVI 分别染毒大肠杆菌 1、2 和 4 h 后大肠杆菌的存活率,结果显示暴露 1、2 和 4 h 后分别有 60%、70% 和近 100% 大肠杆菌灭活,直接表明其毒性效应与暴露时间存在联系。

### 3.2 环境条件

NZVI 在修复污染场地进行修复治理时客观存在的环境因素能够改变其在环境中的物理化学性质,从而可能会影响 NZVI 对生物体的毒性效应。pH 可以影响纳米颗粒的表面电荷,从而影响颗粒的团聚以及与细菌间的作用力,同时,纳米颗粒所处体系中的溶解氧可能会影响金属氧化物纳米颗粒的表

面性质或溶解行为。Lee 等<sup>[23]</sup>有氧和无氧的条件下进行 NZVI 毒性研究,结果是在厌氧条件下表现出严重毒性,而在有氧情况下轻微的毒性,NZVI 会对大肠杆菌造成明显的细胞损伤;Kim 等<sup>[24]</sup>也得出相类似的结果,并认为 NZVI 会破坏大肠杆菌细胞膜。

环境介质中的常规配体(氯、硫、磷酸、有机质等)也是影响 NZVI 颗粒毒性效应的因素<sup>[31,46]</sup>。配体可以依附于纳米材料表面,从而影响纳米材料的表面特性,束缚纳米颗粒所释放出来的金属离子,降低其生物有效性,减轻其所产生的毒性效应<sup>[62]</sup>。Chen 等<sup>[46]</sup>报道了在腐殖酸存在下,NZVI 对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的杀菌毒性有所减轻,因为它们吸附在 NZVI 颗粒和细菌细胞上,使两者之间的直接接触最小化。Li 等<sup>[31]</sup>也得出相类似的结果,当 NZVI 颗粒表面吸附有机质或者聚合物(聚苯乙烯磺酸盐、聚天冬氨酸)时,大肠杆菌在暴露 60 min 之后,其对大肠杆菌的抑制率会有所降低,从 2.2-log 降低至 0.2-log;并发现裸露的 NZVI 颗粒能够附着于大肠杆菌表面,而被吸附与 NZVI 上的聚合物或有机质可以有效地阻止零价纳米铁颗粒在大肠杆菌表面的附着,因而降低 NZVI 所产生的毒性作用。

NZVI 颗粒在进入水体之后,除受水体水质影响外,可能还会与共存污染物(天然或人工纳米颗粒、表面活性剂、有机污染物、重金属离子)发生作用,从而影响 NZVI 颗粒对微生物的毒性效应。细菌作为原核细胞不能通过细胞的胞饮作用吞噬 NZVI 颗粒,因此 NZVI 颗粒可能不会促进共存污染物或者  $\text{Fe}^{2+}$  离子在细胞内的积累,相反可能会降低共存污染物的生物可利用性。同时,共存污染物如其他纳米颗粒或表面活性剂可能会影响纳米颗粒表面电荷、团聚性和溶解性等,进一步影响纳米颗粒对细菌的毒性效应<sup>[34]</sup>,目前还未见有关多种纳米颗粒共同作用下对生物体的毒性研究的报道。因此,研究 NZVI 毒性应当综合考虑环境因素对其毒性效应的影响。

## 4 展望 (Prospects)

(1) NZVI 的生态安全性已经引起了全世界范围学者的关注,虽然已有报道氧化损伤、细胞膜损伤等可能的机制,然而由于其毒性机制和影响因素比较复杂,实验条件、方法等存在差异,得到的结果也存在差异性。当前,针对 NZVI 的生物效应研究大多在实验室条件下开展,实验过程中所有条件都被精确控制;而实际环境中存在本土植物、共存微生物等

影响 NZVI 的生物可利用性与生物效应。因此, 证明这些影响因子对于客观评价 NZVI 的暴露风险至关重要。

(2) NZVI 在实际场地进行污染修复过程中的迁移转化和扩散受到水文地质、水文条件等环境背景值的影响, 目前研究中很多环境参数都是人为设定, 而实际环境条件相对复杂, 在实际环境中 NZVI 的物理化学性质可能会对其存在形态及毒性产生影响, 在实验条件下获得的剂量效应可能与实际环境中得到的毒性效应有所偏差。

(3) NZVI 微生物毒性效应结论大多基于水体、培养基等培养体系, 忽略了实际场地中本土植物以及本土其他微生物对 NZVI 毒性效应的影响, 无法真实反映其原位生态学和生物学效应, 使得实验研究结论的真实性不够; 并且目前有关 NZVI 毒性方面的研究大多都是短期实验, 而微生物群落对 NZVI 的响应可能是一个长期、缓慢的过程。因此, 加强 NZVI 对实际场地微生物和微生物群的生态效应研究以及 NZVI 对微生物生态效应的长期研究也是十分重要的。

(4) 目前, 对于 NZVI 材料的生物毒性效应研究已有一定的积累, 对其致毒机理的讨论也达成了一些共识, 如 ROS 的产生及其对生物体的毒害作用是迄今最为普遍接受的一种 NZVI 材料致毒机制。但是由于实验条件、选材、手段等差异, 获得的结论亦不尽相同, 因而建立一套相对完整、科学的 NZVI 毒性试验标准方法格外重要。

通讯作者简介: 安达(1979-), 女, 副研究员, 博士, 主要从事地下水风险评估研究。

#### 参考文献(References):

- [1] Cao J, Elliott D, Zhang W. Perchlorate reduction by nanoscale iron particles [J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 2005, 7(4): 499-506
- [2] An Y, Dong Q, Zhang K. Bioinhibitory effect of hydrogenotrophic bacteria on nitrate reduction by nanoscale zero-valent iron [J]. *Chemosphere*, 2014, 103: 86-91
- [3] Lowry G V, Johnson K M. Congener-specific dechlorination of dissolved PCBs by microscale and nanoscale zero-valent iron in a water/methanol solution [J]. *Environmental Science and Technology*, 2004, 38(19): 5208-5216
- [4] Cheng R, Wang J, Zhang W. Comparison of reductive dechlorination of p-chlorophenol using FeO and nanosized FeO [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 144(1): 334-339
- [5] Varanasi P, Fullana A, Sidhu S. Remediation of PCB contaminated soils using iron nano-particles [J]. *Chemosphere*, 2007, 66(6): 1031-1038
- [6] Klimkova S, Cernik M, Lacinova L, et al. Zero-valent iron nanoparticles in treatment of acid mine water from *in situ* uranium leaching [J]. *Chemosphere*, 2011, 82(8): 1178-1184
- [7] Wang C, Luo H, Zhang Z, et al. Removal of As (III) and As (V) from aqueous solutions using nanoscale zero valent iron-reduced graphite oxide modified composites [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2014, 268: 124-131
- [8] Liu T, Wang Z L, Yan X, et al. Removal of mercury (II) and chromium (VI) from wastewater using a new and effective composite: Pumice-supported nanoscale zero-valent iron [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2014, 245: 34-40
- [9] Stefaniuk M, Oleszczuk P, Ok Y S, et al. Review on nano zerovalent iron (nZVI): From synthesis to environmental applications [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2016, 287: 618-632
- [10] Cheng L, Zhang L Q, Yang K, et al. Toxicity of iron-based nanoparticles to green algae: Effects of particle size, crystal phase, oxidation state and environmental aging [J]. *Environmental Pollution*, 2016, 218: 505-512
- [11] Busch J, Meißner T, Potthoff A, et al. A field investigation on transport of carbon-supported nanoscale zero-valent iron (nZVI) in groundwater [J]. *Journal of Contaminant Hydrology*, 2015, 181: 59-68
- [12] Ludwig K L, Peter W, Pius Manser, et al. Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: Influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress [J]. *Environmental Science and Technology*, 2007, 41(11): 4158-4163
- [13] 金星龙, 覃春丽, 李晓, 等. 纳米材料的微生物效应研究进展[J]. *天津理工大学学报*, 2011, 27(5): 73-78
- [14] Jin X L, Qin C L, Li X, et al. Research progress on microbial effects of nanomaterials [J]. *Journal of Tianjin University of Technology*, 2011, 27(5): 73-78 (in Chinese)
- [15] Emilie L, Nathan B, Mark R W, et al. A review of the environmental implications of *in situ* remediation by nanoscale zero valent iron (nZVI): Behavior, transport and impacts on microbial communities [J]. *Science of the Total Environment*, 2016, 565: 889-901
- [16] Service R F. American Chemical Society Meeting. Nanomaterials show signs of toxicity [J]. *Science*, 2003, 300(5617): 243
- [17] Brumfiel G. Nanotechnology: A little knowledge [J]. *Nature*, 2003, 424(6946): 246-248

- [17] Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2005, 113: 823-839
- [18] 孙耀琴, 申聪聪, 葛源. 典型纳米材料的土壤微生物效应研究进展[J]. *生态毒理学报*, 2016, 11(5): 2-13  
Sun Y Q, Shen C C, Ge Y. Review on microbiological effects of typical nanomaterials in soil ecosystem [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2016, 11(5): 2-13 (in Chinese)
- [19] 葛钊. 纳米氧化锌对大肠杆菌的致毒机理及生物膜对其毒性的影响[D]. 南京: 南京大学, 2013: 32-42  
Ge M. Toxicity mechanism of ZnO nanoparticles to *Escherichia coli* and the influence of biofilms [D]. Nanjing: Nanjing University, 2013: 32-42 (in Chinese)
- [20] Binh N D, Imsapsangworn C, Kim O N T, et al. Sequential anaerobic-aerobic biodegradation of 2, 3, 7, 8-TCDD contaminated soil in the presence of CMC-coated nZVI and surfactant [J]. *Environmental Technology*, 2016, 37(3): 388-398
- [21] Chaithawiwat K, Vangnai A, McEvoy J M, et al. Impact of nanoscale zero valent iron on bacteria is growth phase dependent [J]. *Chemosphere*, 2016, 144: 352-359
- [22] 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 and Technology*, 2008, 42: 6730-6735
- [23] 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
- [24] Kim J Y, Park H J, Lee C, et al. Inactivation of *Escherichia coli* by nanoparticulate zerovalent iron and ferrous ion [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76: 7668-7670
- [25] Kim Y M, Murugesan K, Chang Y Y, et al. Degradation of polybrominated diphenyl ethers by a sequential treatment with nanoscale zero valent iron and aerobic biodegradation [J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2012, 87(2): 216-224
- [26] Fajardo C, Ortíz L T, Rodríguez-Membibre M L, et al. Assessing the impact of zero-valent iron (ZVI) nanotechnology on soil microbial structure and functionality: A molecular approach [J]. *Chemosphere*, 2012, 86: 802-808
- [27] Diao M, Yao M. Use of zero-valent iron nanoparticles in inactivating microbes [J]. *Water Research*, 2009, 43: 5243-5251
- [28] 刘文娟, 靳竞男, 马家恒, 等. 荧光碳点纳米材料对大肠杆菌的毒性研究[J]. *化学与生物工程*, 2015, 32(9): 26-30
- [29] Chen Q, Gao M, Li J, et al. Inactivation and magnetic separation of bacteria from liquid suspensions using electro-sprayed and nonelectro-sprayed nZVI particles: Observations and mechanisms [J]. *Environmental Science and Technology*, 2016, 46: 2360-2367
- [30] Dong H R, Xie Y K, Zeng G M, et al. The dual effects of carboxymethyl cellulose on the colloidal stability and toxicity of nanoscale zero-valent iron [J]. *Chemosphere*, 2016, 144: 1682-1689
- [31] Li Z, Greden K, Alvarez P J J, et al. Adsorbed polymer and NOM limits adhesion and toxicity of nano scale zerovalent iron to *E. coli* [J]. *Environmental Science and Technology*, 2010, 44: 3462-3467
- [32] Kumar N, Omeregie E O, Rose J, et al. Inhibition of sulfate reducing bacteria in aquifer sediment by iron nanoparticles [J]. *Water Research*, 2014, 51: 64-72
- [33] Kirschling T L, Gregory K B, Minkley J, et al. Impact of nanoscale zero valent iron on geochemistry and microbial populations in trichloroethylene contaminated aquifer materials [J]. *Environmental Science and Technology*, 2010, 44: 3474-3480
- [34] 李梅. 水环境中 ZnO 纳米颗粒对大肠杆菌的毒性及影响因素[D]. 杭州: 浙江大学, 2012: 1-11  
Li M. The toxicity and impact factors of ZnO nanoparticles to *Escherichia coli* in aquatic environment [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012: 1-11 (in Chinese)
- [35] Emilie L, Nathan B, Mark R W, et al. A review of the environmental implications of *in situ* remediation by nanoscale zero valent iron (nZVI): Behavior, transport and impacts on microbial communities [J]. *Science of the Total Environment*, 2016, 565: 889-901
- [36] Keenan C R, Goth-Goldstein R, Lucas D, et al. Oxidative stress induced by zero-valent iron nanoparticles and Fe (II) in human bronchial epithelial cells [J]. *Environmental Science and Technology*, 2009, 43(12): 4555-4560
- [37] 陈柏兵. 嵌入型纳米零价铁的稳定性及微生物毒性机制研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2016: 11-24
- [38] Xia T, Kovochich M, Liang M. Cationic polystyrene nanosphere toxicity depends on cell-specific endocytic and mitochondrial injury pathways [J]. *ACS Nano*, 2008, 2(1): 85-96
- [39] Sadeghi L, Tanwir F, Babadi V Y. *In vitro* toxicity of iron oxide nanoparticle: Oxidative damages on Hep G2 cells [J]. *Experimental Toxicologic Pathology Official Journal of the Gesellschaft Fur Toxikologische Pathologie*, 2015, 67(2): 197-203
- [40] 朱岩, 张亚雷, 代朝猛, 等. 纳米零价铁颗粒用于地下水原位修复的研究进展[J]. *现代农业科技*, 2015(4): 204-208



- Zhu Y, Zhang Y L, Dai C M, et al. A review on application of nanoscale zero valent iron particles for contaminated subsurface site remediation [J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2015(4): 204-208 (in Chinese)
- [41] 葛兴彬, 王振虹, 郭楚奇, 等. 纳米零价铁的生态毒性效应研究进展[J]. *生态毒理学报*, 2015, 10(3): 28-37
- Ge X B, Wang Z H, Guo C Q, et al. Review of the ecotoxicity of nanoscale zero-valent iron [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2015, 10(3): 28-37 (in Chinese)
- [42] Kumar A, Pandey A K, Singh S S, et al. Cellular uptake and mutagenic potential of metal oxide nanoparticles in bacterial cells [J]. *Chemosphere*, 2011, 83(8): 1124-1132
- [43] Diao M, Yao M. Use of zero-valent iron nanoparticles in inactivating microbes [J]. *Water Research*, 2009, 43: 5243-5251
- [44] Lee C, Kim J Y, Lee W I, et al. Bactericidal effect of zerovalent iron nanoparticles on *Escherichia coli* [J]. *Environmental Science and Technology*, 2008, 42(13): 4927-4933
- [45] Liang J, Xia X Q, Zaman W Q, et al. Bioaccumulation and toxic effects of decabromodiphenyl ether in the presence of nanoscale zero-valent iron in an earthworm-soil system [J]. *Chemosphere*, 2017, 169: 78-88
- [46] Chen J, Xiu Z, Lowry G V, et al. Effect of natural organic matter on toxicity and reactivity of nano-scale zero-valent iron [J]. *Water Research*, 2011, 45: 1995-2001
- [47] Sadeghi L, Tanwir F, Babadi V Y. *In vitro* toxicity of iron oxide nanoparticle: Oxidative damages on Hep G2 cells [J]. *Experimental & Toxicologic Pathology Official Journal of the Gesellschaft Fur Toxikologische Pathologie*, 2015, 67(2): 197-203
- [48] Nel A, Xia T, Madler L. Toxic potential of materials at the nanolevel [J]. *Science*, 2006, 311(5761): 622-627
- [49] 王学, 李勇超, 李铁龙, 等. 零价纳米铁对大肠杆菌的毒性效应[J]. *生态毒理学报*, 2012, 7(1): 49-56
- Wang X, Li Y C, Li T L, et al. Toxicity effects of nano-Fe<sup>0</sup> on *Escherichia coli* [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2012, 7(1): 49-56 (in Chinese)
- [50] Franklin N M, Rogers N J, Apte S C, et al. Comparative toxicity of nanoparticles ZnO, bulk ZnO, and ZnCl<sub>2</sub> to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The importance of particle solubility [J]. *Environmental Science and Technology*, 2007, 41(24): 8484-8490
- [51] Limbach L K, Wick P, Manser P, et al. Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: Influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress [J]. *Environmental Science and Technology*, 2007, 41(11): 4158-4163
- [52] Karlsson H L, Cronholm P, Gustafsson J, et al. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: A comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2008, 21(9): 1726-1732
- [53] Kim J Y, Lee C, Love D C, et al. Inactivation of MS2 coliphage by ferrous ion and zero-valent iron nanoparticles [J]. *Environmental Science and Technology*, 2011, 45(16): 6978-6984
- [54] 汪保林, 邱慧. 纳米材料体外细胞毒性研究现状与展望[J]. *世界中医药*, 2016, 12(2): 446-451
- Wang B L, Qiu H. Research situation and prospects on *in-vitro* cytotoxicity of nanomaterials [J]. *World Chinese Medicine*, 2016, 12(2): 446-451 (in Chinese)
- [55] 覃春丽. 纳米材料对细菌的生物效应研究[D]. 天津: 天津理工大学, 2012: 9-20
- Qin C L. The biological effect of nanomaterials on bacteria [D]. Tianjing: Tianjing University of Technology, 2012: 9-20 (in Chinese)
- [56] Liu W, Wu Y, Wang G, et al. Impact of nanoparticles on human cells: Effect of particle size [J]. *Nanotoxicology*, 2010, 4(3): 319-330
- [57] Handy R D, Von der Kammer F, Lead J R, et al. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles [J]. *Ecotoxicology*, 2008, 17(4): 287-314
- [58] Phenrat T, Saleh N, Sirk K, et al. Stabilization of aqueous nanoscale zerovalent iron dispersions by anionic polyelectrolytes: Adsorbed anionic polyelectrolyte layer properties and their effect on aggregation and sedimentation [J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 2008, 10(5): 795-814
- [59] Zhou L, Thanh T L, Gong J, et al. Carboxymethyl cellulose coating decreases toxicity and oxidizing capacity of nanoscale zerovalent iron [J]. *Chemosphere*, 2014, 104: 155-161
- [60] Chen P J, Wu W L, Wu C W. The zerovalent iron nanoparticle causes higher developmental toxicity than its oxidation products in early life stages of medaka fish [J]. *Water Research*, 2013, 47: 3899-3909
- [61] Le T T, Murugesan K, Kim E J, et al. Effects of inorganic nanoparticles on viability and catabolic activities of *Agrobacterium* sp. PH-08 during biodegradation of dibenzofuran [J]. *Biodegradation*, 2014, 25: 655-668
- [62] 陈安伟, 曾光明, 陈桂秋, 等. 金属纳米材料的生物毒性效应研究进展[J]. *环境化学*, 2014, 33(4): 568-575
- Chen A W, Zeng G M, Chen G Q, et al. Advance in research on toxicity of metal nanomaterials [J]. *Environmental Chemistry*, 2014, 33(4): 568-575 (in Chinese) ◆