

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20180412002

舒昆慧, 张丽, 伍玲丽, 等. 纳米银与银离子对土壤微生物及酶活性的影响[J]. 生态毒理学报, 2019, 14(2): 242-250

Shu K H, Zhang L, Wu L L, et al. Effects of silver nanoparticles and silver ions on soil microorganisms and enzyme activities [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2019, 14(2): 242-250 (in Chinese)

纳米银与银离子对土壤微生物及酶活性的影响

舒昆慧, 张丽, 伍玲丽, 司友斌*

农田生态保育与污染防控安徽省重点实验室, 安徽农业大学资源与环境学院, 合肥 230036

收稿日期: 2018-04-12 录用日期: 2018-07-10

摘要: 为研究纳米银和银离子对土壤微生物的影响, 采用土壤培养方式, 对不同剂量纳米银(10、50、100 mg·kg⁻¹)和银离子(1、5、10 mg·kg⁻¹)暴露下黄褐土、砖红壤中可培养微生物数量及土壤酶活性(脲酶、荧光素二乙酸酯水解酶、蔗糖酶、过氧化氢酶)进行研究, 并采用纯培养方法对纳米银和银离子暴露下的大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)凋亡情况进行检测, 对纳米银释放的银离子毒性进行评估。结果表明, 随着纳米银剂量的增加, 土壤可培养微生物数量显著减少, 脲酶和过氧化氢酶活性降低, 蔗糖酶、荧光素二乙酸酯水解酶(FDA酶)活性没有显著变化; 银离子处理中微生物数量明显减少, 但土壤酶活性被激活。10 mg·L⁻¹纳米银暴露1 h后大肠杆菌、金黄色葡萄球菌凋亡率、死亡率增高; 随着培养时间的延长, 纳米银缓慢释放银离子, 并促进大肠杆菌的凋亡。综上分析, 纳米银能够抑制土壤可培养微生物生长和酶活性, 其中脲酶、过氧化氢酶对纳米银较为敏感, 蔗糖酶、FDA酶受纳米银的影响较小; 纳米银的毒性一方面是其本身的特异抗菌性, 也有部分来自缓慢释放的银离子。

关键词: 纳米银; 银离子; 微生物数量; 酶活性; 土壤

文章编号: 1673-5897(2019)2-242-09 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effects of Silver Nanoparticles and Silver Ions on Soil Microorganisms and Enzyme Activities

Shu Kunhui, Zhang Li, Wu Lingli, Si Youbin*

Anhui Province Key Laboratory of Farmland Ecological Conservation and Pollution Prevention, School of Resources and Environment, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

Received 12 April 2018 accepted 10 July 2018

Abstract: In order to evaluate the microbial toxicity of silver nanoparticles (AgNP) and silver ions in soils, the incubation experiments were conducted to investigate the effect of nanosilver (0, 10, 50, 100 mg·kg⁻¹) and silver acetate (1, 5, 10 mg·kg⁻¹) on microbial population and enzyme activities (urease, fluorescein diacetate hydrolase, invertase and catalase) in yellow cinnamon and laterite. The apoptotic cells of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* exposed to nanosilver and silver ions were also determined by the pure culture test, and silver ions released from nanosilver were evaluated. The results showed that with the increase of nanosilver content, the microbial quantities decreased significantly, the activities of urease and catalase decreased, but there was no significant change

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(41430752)

作者简介: 舒昆慧(1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向为土壤微生物生态, E-mail: 794666557@qq.com

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: youbinsi@ahau.edu.cn

in invertase and fluorescein diacetate (FDA) hydrolase activities. The population of microorganisms in the silver acetate treatment significantly decreased, while the soil enzyme activities were activated. The apoptosis rate and mortality of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* increased after exposure to $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ nanosilver for 1 hour. As the culture time prolonged, nanosilver slowly released silver ions and promoted the apoptosis of *E. coli*. In summary, nanosilver can inhibit the growth of culturable microorganisms and the activity of enzyme in soil. Urease and catalase are sensitive to nanosilver but invertase and FDA hydrolase are less affected by nanosilver. The toxicity of nanosilver is from its own specific antibacterial properties, also partly from the slow release of silver ions.

Keywords: silver nanoparticles; silver ions; microbial population; enzyme activity; soil

纳米银(AgNP)由于其独特抗菌效果被广泛用于医疗、洗护用品、衣物鞋袜中^[1]。家庭和医疗废物的不正确处理、污水污泥和生物固体的应用、废水灌溉以及纳米银构成的有机肥料/杀虫剂应用等,导致纳米银进入农业土壤^[2],在土壤中长期保留或被生物体吸收,并作为生态毒物在食物链中积累^[3],对土壤微生物造成潜在的威胁。

土壤微生物是农田生态系统的重要组成部分,是维持土壤肥力和作物生产的重要指标^[4]。土壤酶主要来自微生物细胞,是土壤动物、植物和微生物的细胞分泌物及其残体的分解物,也是土壤新陈代谢的主要影响因素,它与土壤微生物一起推动植物的营养吸收^[5]。土壤中存在较为广泛的酶类是氧化还原酶和水解酶,对土壤肥力起到重要作用。纳米粒子的类型、粒径及与土壤接触的时间、土壤类型都会影响酶的活性。Du等^[6]研究发现纳米 TiO_2 和 ZnO 抑制土壤蛋白酶、过氧化氢酶和过氧化物酶,而对脲酶活性没有影响。Peyrot等^[7]的研究显示,纳米银抑制了土壤磷酸单酯酶、芳香基硫酸酯酶、 β -d-葡萄糖苷酶和氨肽酶,并且有机质含量高的土壤酶活性较高,受纳米银影响较小。王秋双等^[8]的研究显示纳米银处理显著抑制土壤脲酶、脱氢酶活性,但对土壤过氧化氢酶与磷酸酶活性基本无影响。

纳米银输入土壤环境会影响土壤的功能菌活性,降低土壤的使用价值^[9]。纳米银的毒性机制主要有:进入细胞内部产生活性氧族(ROS)^[10],造成细胞内脂质、碳氢化合物、蛋白质和DNA氧化损伤^[6];与膜蛋白相互作用,改变生物膜的通透性及膜呼吸链的电子传递^[9-10];抑制DNA复制,影响功能基因的正常表达^[11-12]。除此之外,纳米银表面易被氧化,在水体、生物体内很容易释放离子态银(Ag^+),而 Ag^+ 影响着纳米银的生物效应和毒性作用。数据表明,纳米银溶液中银阳离子比例为0.94%~1.01%^[13],释放率与时间呈非线性增加,而 Ag^+ 与

含巯基(-SH)的大分子有很强的结合力,可使微生物失活^[14]。 Ag^+ 具有抑制细菌生长及杀菌的能力,但其抑制细菌生长的能力取决于 Ag^+ 浓度^[15]。

程序性细胞死亡是涉及多细胞生物体发育和体内平衡的基因导向过程^[16]。相比于高等真核生物,细菌细胞经常暴露于极端小环境的压力之下,如氧化压力、渗透压力、pH变化和DNA损伤物质等,在环境压力的诱导下,细菌发生应激适应,导致细胞的功能分化、死亡或者休眠^[17]。研究表明,原核生物也具有表现出程序性细胞死亡的能力^[16]。细菌的细胞程序性死亡目的是为了在各种极端条件下延续种群。诱导凋亡的本质是产生了活性氧物质,而纳米银可以刺激细菌产生活性氧物质^[18]。当细胞发生凋亡时,其膜上的磷脂酰丝氨酸会发生外翻暴露^[19],可以采用Annexin V-PI双染色来检测细菌的凋亡现象。

目前,人们对纳米银的关注大多是其在环境中的迁移转化,而对纳米银和银离子的环境微生物效应研究还不是很多。因此,本文通过不同剂量纳米银和银离子暴露下土壤微生物和酶活性的变化,了解纳米银对微生物的影响;同时针对纳米银的抗菌特性,以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为研究对象,初步探究纳米银对细菌凋亡的影响,为纳米银的土壤微生物毒性评价提供数据参考。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 材料

1.1.1 供试材料

纳米银粉末,购于南京埃瑞普纳米材料有限公司,纯度 $\geq 99\%$ 。灰色,平均粒径 $20 \sim 80 \text{ nm}$ 、比表面积 $2.5 \sim 15 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ 、松装密度 $0.25 \sim 0.6 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$,无包裹。

醋酸银(CH_3COOAg ,又名乙酸银),纯度 $\geq 99.5\%$,密度 $3.25 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$,分子量166.91,CAS号563-63-3,购自西亚试剂。

1.1.2 土壤样品采集

土壤样品分别采自安徽合肥的黄褐土和广东肇庆的砖红壤,采样深度为0~20 cm。采集土样后及时拣出可见植物残体、根系及土壤动物,风干,过2 mm筛,充分混匀装袋,备用,供试土壤基本理化性质见表1。

1.2 试验设计

试验剂量设置:根据农田土壤污泥施用量^[20-21]推测纳米银可累积到 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,据此设置纳米银剂量为低($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、中($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、高($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)3种。银离子剂量是以 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 纳米银释放的银离子量(1%)为基础,设置低($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、中($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、高($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)3种。

供试土壤培养:采用干混法将纳米银与少量风干土混合后加入新鲜过筛土壤样品,使得土壤中纳米银含量为 10 、 50 、 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,每组3个平行,并设置对照。调节土壤含水量至田间最大持水量60%,将土壤样品置于恒温恒湿培养箱内 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养,7 d后取样测定土壤可培养微生物数量和酶活性。参照上述土壤培养方法,添加 CH_3COOAg ,使得土壤中 Ag^+ 含量为 1 、 5 、 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,作为 Ag^+ 处理对照实验。

1.3 纳米银和银离子对土壤微生物的影响

1.3.1 土壤可培养微生物数量测定

供试土壤培养7 d后称取10 g新鲜土样,加入盛90 mL无菌水的三角瓶中,振荡10 min,取1 mL悬液到9 mL无菌水中,按10倍法依次稀释,土壤稀释倍数数据实际情况而定。细菌、放线菌、真菌测定培养基分别为牛肉膏蛋白胨琼脂培养基、改良高氏一号培养基、马丁氏培养基^[22]。

1.3.2 土壤酶活性测定

土壤酶活性测定参照《土壤与环境微生物研究

法》^[22],土壤蔗糖酶采用二硝基水杨酸比色法测定,其活性以 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下每克土24 h后的葡萄糖量表示;脲酶测定采用苯酚钠-次氯酸钠比色法,其活性以每克土壤24 h酶解尿素产生铵态氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$)的毫克数来表示;荧光素二乙酸酯(fluorescein diacetate, FDA)水解酶采用比色法测定,其活性以每克土20 min内生成的荧光素表示;过氧化氢酶采用高锰酸钾滴定法测定,其活性以每克土30 min分解 H_2O_2 的毫克数表示。

1.3.3 纳米银和银离子对细菌凋亡的影响

试验以大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC 25922和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 25923作为微生物学研究对象,以LB肉汤培养基对细菌进行培养,细菌生长至对数期后加入纳米银和银离子。培养基中纳米银和银离子暴露浓度分别为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。细胞凋亡采用Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(BD 556547),测定条件为激发波长488 nm,发射波长530 nm,测定仪器为流式细胞仪(FACSCalibur,美国BD)。

1.3.4 培养基中银离子溶出测定

将LB液体培养基灭菌后,添加 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 纳米银, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 摇床避光培养,于1、2、3、4 h取样用3 kDa超滤离心管(Millipore, Amicon, USA) $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心30 min,滤液用ICP-MS测定 Ag^+ 量^[23],每处理3个重复。

1.4 数据处理与分析

实验数据以平均值 \pm 标准差表示,数据采用SPSS 17.0统计软件进行分析,并对不同处理间的数据用单因素方差分析(ANOVA)和Duncan多重比较进行差异显著性检验($P < 0.05$),利用Origin 8.5绘图,FlowJO 7.5进行凋亡分析。

表1 供试土壤的基本理化性质

Table 1 Basic physical and chemical properties of experimental soil

土壤类型 Soil type	pH	CEC ($\text{cmol} \cdot \text{kg}^{-1}$)	有机质/($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) Organic matter/($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	砂粒/% Sand/%	粉粒/% Silt/%	粘粒/% Clay/%	WHC _{max} /%
黄褐土 Yellow cinnamon	6.70	12.40	19.06	16.10	55.00	28.90	42.38
砖红壤 Laterite	5.54	13.40	33.24	19.20	53.70	27.10	58.58

注:CEC是阳离子交换量;WHC_{max}是田间最大持水量。

Note: CEC is cation exchange capacity; WHC_{max} is maximum water holding capacity.

2 结果 (Results)

2.1 纳米银与银离子对土壤可培养微生物数量的影响

不同剂量纳米银暴露下土壤细菌、真菌、放线菌的数量显著降低(图 1)。10 mg·kg⁻¹ 纳米银暴露下黄褐土中细菌、真菌、放线菌数量相较于对照组分别减少 27.6%、58.3%、86.8%，砖红壤中可培养微生物数量分别减少 23.9%、23.4%、19.6%。随着纳米银剂

量的增加,黄褐土、砖红壤可培养微生物数量显著降低。当纳米银暴露剂量为 100 mg·kg⁻¹时,黄褐土细菌、真菌、放线菌分别减少 90.4%、88.3%、97.9%，砖红壤中微生物数量分别减少 69.8%、67.2%和 77.2%，说明剂量是纳米银毒性的重要影响因素。不同剂量银离子对土壤可培养微生物数量的抑制在 5.7%~91.7% 不等,银离子剂量越高,微生物数量越少。银离子处理下土壤微生物数量虽然也显著减少,

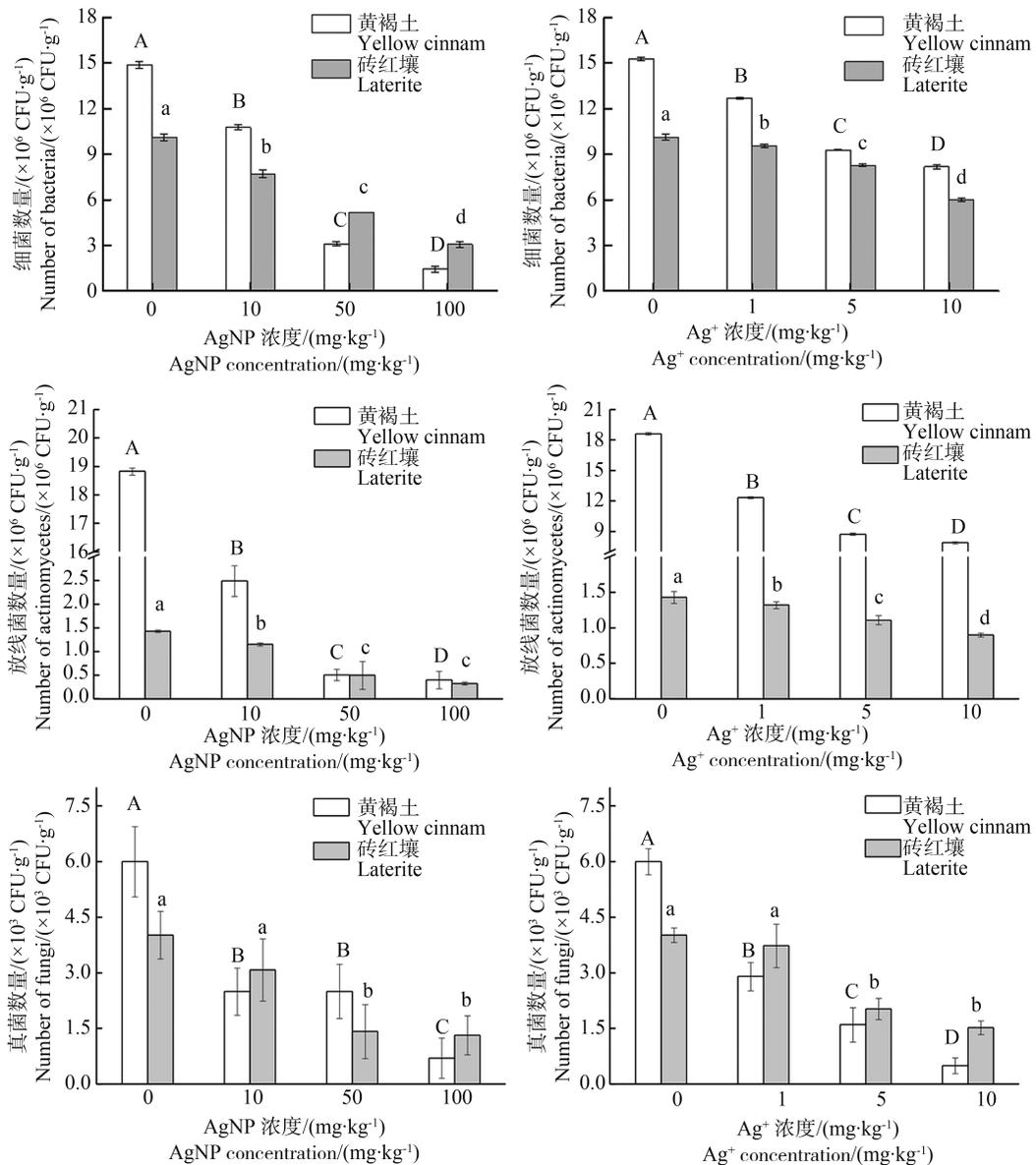


图 1 不同剂量纳米银和银离子处理 7 d 后土壤微生物数量变化

注:字母不相同表示组间差异显著(P<0.05),大写字母表示黄褐土,小写字母表示砖红壤,下同。

Fig. 1 Changes in soil microorganisms population after treatment with different doses of AgNP and Ag⁺ for 7 d

Note: Values with different letters are significantly different from each other (P<0.05).

Capital letters represent yellow cinnamon, lowercase letters represent laterite. The same below.

但降低幅度小于纳米银处理。1~10 mg·kg⁻¹银离子处理下,土壤细菌、放线菌、真菌数量分别降低5.7%~17.0%、7.7%~40.1%、7.2%~51.7%,远远低于100 mg·kg⁻¹纳米银带来的影响(微生物数量减少68.7%~97.8%),说明在土壤中纳米银的毒性可能与其释放的银离子有关,但更多的是其本身的抗菌性。

2.2 纳米银与银离子对土壤酶活性的影响

添加不同剂量纳米银和银离子后土壤酶活性受到不同程度的影响(图2)。随着纳米银剂量的增加,土壤蔗糖酶、FDA酶活性受到轻度抑制,其活性与对照组相比分别降低16.6%~29.1%、5.1%~27.8%,土壤脲酶、过氧化氢酶活性分别降低12.5%~54.0%、13.0%~38.9%。可见,土壤中脲酶、过氧化氢酶对纳米银较为敏感。1、5、10 mg·kg⁻¹银离子处理下土壤酶活性没有受到抑制反而被激活,这种促进作用在砖红壤中尤为明显。在1、5、10 mg·kg⁻¹银离子处理下砖红壤蔗糖酶、脲酶、FDA酶、过氧化氢酶活性均出现不同程度的增强;黄褐土过氧化氢酶活性略有增强,蔗糖酶、脲酶活性没有显著变化,只有FDA酶活性受到抑制。银离子对土壤酶活性的影响没有纳米银强,这可能与其浓度有关。

2.3 纳米银与银离子对细菌凋亡的影响

纳米银暴露1 h后大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)凋亡情况如图3所示,Q1、Q2、Q3、Q4分别表示死亡细胞、晚期凋亡细胞、早期凋亡细胞和正常细胞。与对照相比,纳米银的添加使得大肠杆菌凋亡过程加快(图3-A),对照组中大肠杆菌凋亡率(早调+晚调)和死亡率分别为1.45%和0.75%,10 mg·L⁻¹纳米银处理下大肠杆菌的凋亡率、死亡率分别为3.86%、3.84%,同时对金黄色葡萄球菌的研究中也出现相似的结果(图3-B),说明纳米银的添加会加速细菌凋亡进程,而细菌的凋亡加快可能与其膜表面蛋白结构被破坏及细胞内部应激反应有关。在环境压力的诱导下,细菌发生应激反应,导致细胞的功能分化、死亡^[17]。0.1 mg·L⁻¹银离子处理中大肠杆菌死亡率和凋亡率均比对照组高,但比纳米银处理组的凋亡率略低;而银离子对金黄色葡萄球菌的影响均比纳米银处理小,但死亡率和凋亡率均明显高于对照处理。这说明纳米银的毒性与其释放的银离子有着密切关系,除了本身的特异杀菌性,释放银离子可能是纳米银毒性的原因之一。

2.4 纳米银的银离子释放动力学及对大肠杆菌凋亡的影响

10 mg·L⁻¹纳米银释放的银离子随时间变化如图4(A)所示。随着暴露时间延长,纳米银释放的银离子量增多,但释放速率较缓慢。暴露1 h后释放的银离子只有6.9 ng·mL⁻¹,暴露4 h后银离子增至15.2 ng·mL⁻¹。银离子溶出速率缓慢可能与培养基有关,LB液体培养基中含大量Cl⁻、SO₄²⁻,容易与银反应产生AgCl、Ag₂S沉淀。10 mg·L⁻¹纳米银对大肠杆菌凋亡的影响与暴露时间相关(图4 B),随着纳米银暴露时间的延长,大肠杆菌早调率先增加后减少,晚调率和死亡率则随着时间延长逐渐升高。暴露1 h后,大肠杆菌凋亡(早调+晚调)、死亡率分别为5.5%、2.3%;暴露4 h后,大肠杆菌凋亡、死亡率分别为9.2%、7.8%。纳米银对大肠杆菌凋亡的影响也呈现缓慢增强的趋势,这可能与培养基溶出银离子逐渐增多有关。

3 讨论(Discussion)

纳米银对土壤环境的影响在近几年逐渐被人们注意到,众多研究表明暴露在纳米银环境下,土壤微生物活性、多样性等会受到受影响。含银140 μg·kg⁻¹的有机污泥能使土壤中柔枝莠竹(*Microstegium vimineum*)的生物量降低32%^[24];10 mg·kg⁻¹纳米银可以显著降低土壤真菌的数量,100 mg·kg⁻¹会显著抑制土壤细菌及放线菌的数量^[8]。这些结果与本研究一致,然而对比纳米银和银离子处理,可以发现银离子对土壤可培养微生物数量和酶活性的影响要低于纳米银,土壤蔗糖酶和过氧化氢酶活性甚至被激活。尽管在大多数研究中,银离子表现出比固态银更大的抗微生物作用,但Kumar等^[25]研究发现,同剂量纳米银和银离子处理下,15 nm聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl pyrrolidone, PVP)包被的纳米银能更有效地抑制土壤硝化作用。有研究表明银离子的毒性具有即时性,对土壤微生物短期(2 h)的影响更大,而纳米银的毒性具有长期性,在培养7 d后毒性最强^[26]。纳米银进入土壤后会释放出Ag⁺,Ag⁺作用于微生物从而影响酶活,在活性污泥中释放出的Ag⁺会导致参与硝化反应的酶活性下降^[27]。最近的研究证明土壤中纳米银转化的Ag₂S纳米颗粒在某种程度上是生物可利用的,并且可能在不同的生物体中引起毒性效应^[28-29]。因此,转化的纳米银仍可能对陆地生物有毒。

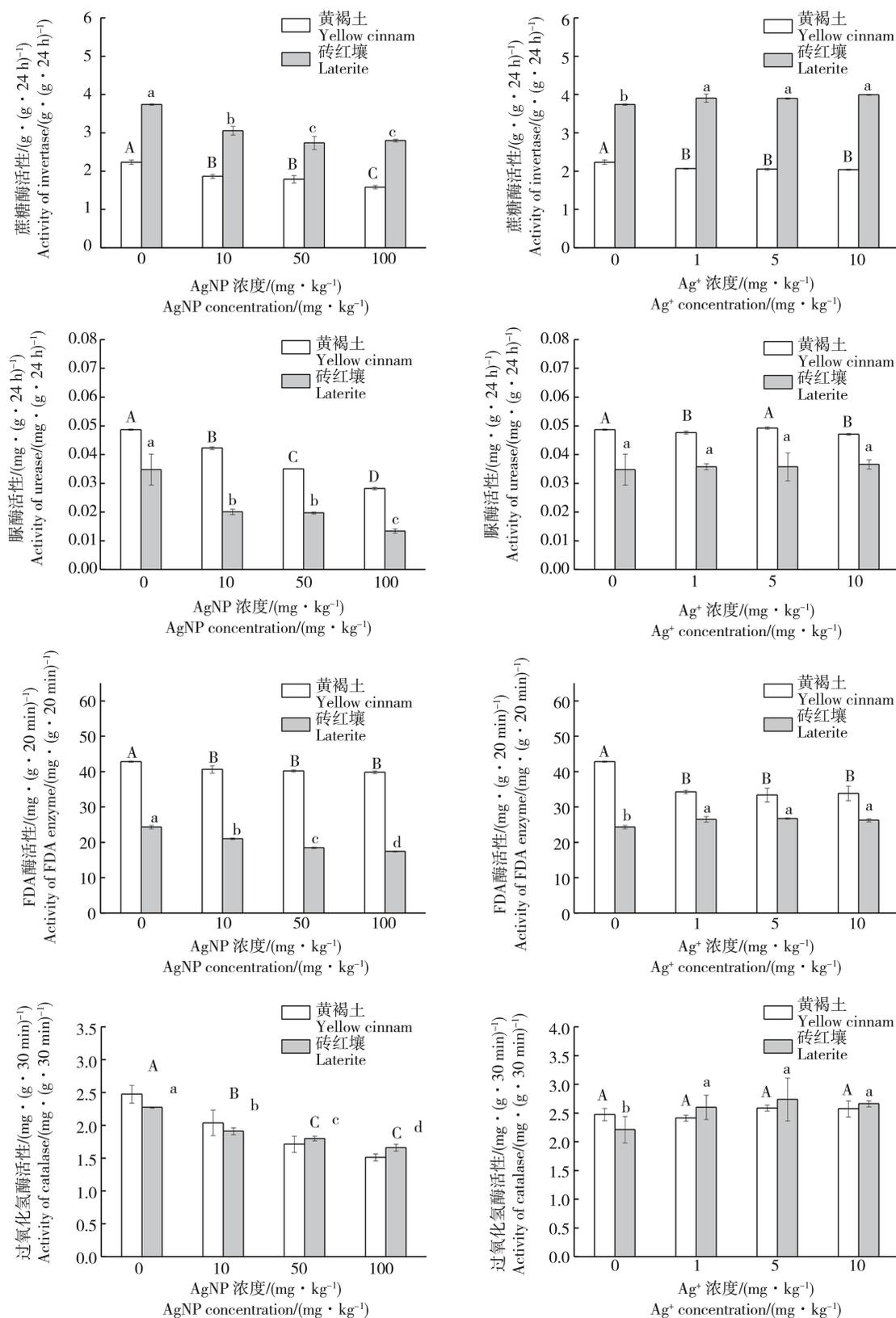


图 2 不同剂量纳米银和银离子处理 7 d 后土壤酶活性的变化

注: FDA 酶表示荧光素二乙酸酯水解酶。

Fig. 2 Changes in soil enzyme activity after treatment with different doses of AgNP and Ag⁺ for 7 d

Note: FDA enzyme stands for fluorescein diacetate hydrolase.

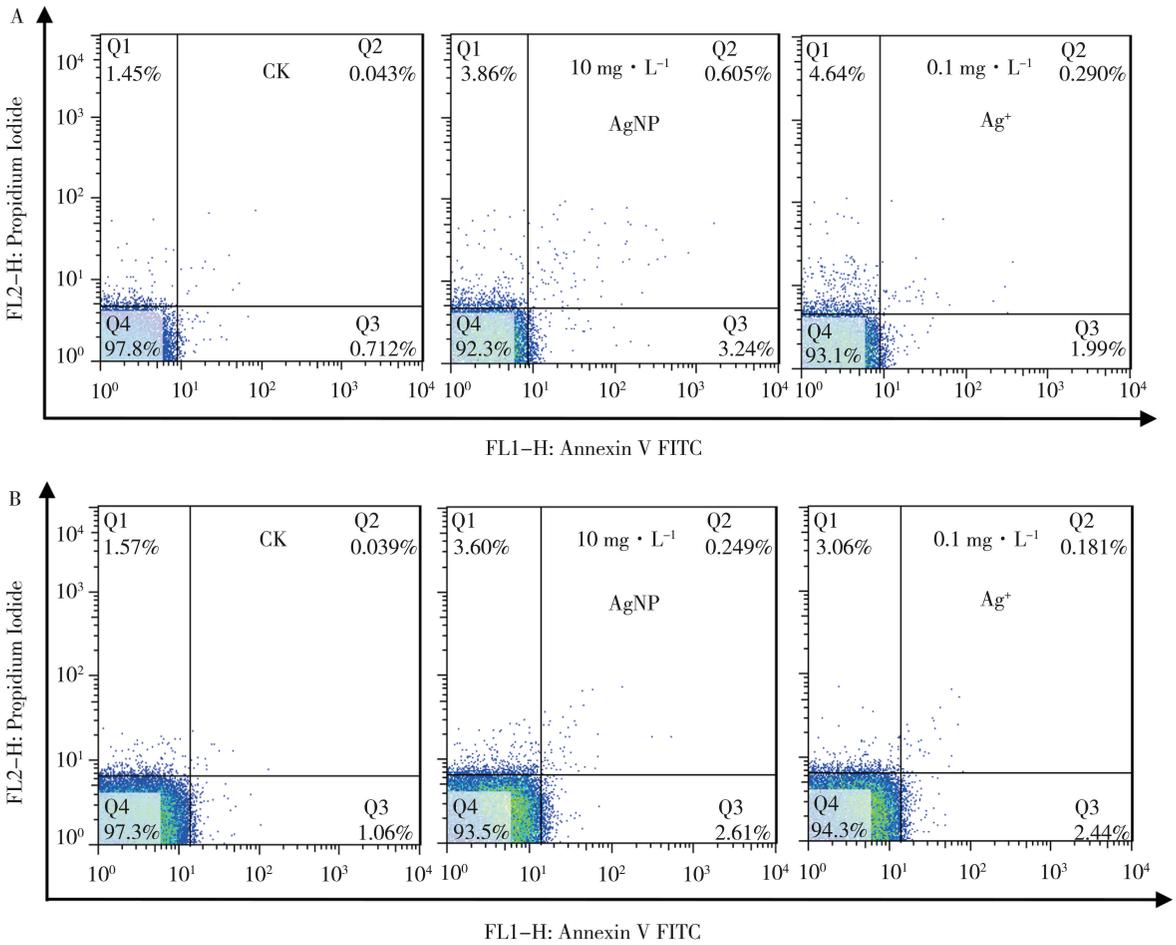


图3 纳米银和银离子暴露1 h后细菌凋亡情况

注:A为大肠杆菌凋亡情况;B为金黄色葡萄球菌凋亡情况。

Fig. 3 The apoptosis of bacteria after exposure to AgNP and Ag⁺ for 1 h

Note: A is apoptosis of *Escherichia coli*; B is apoptosis of *Staphylococcus aureus*.

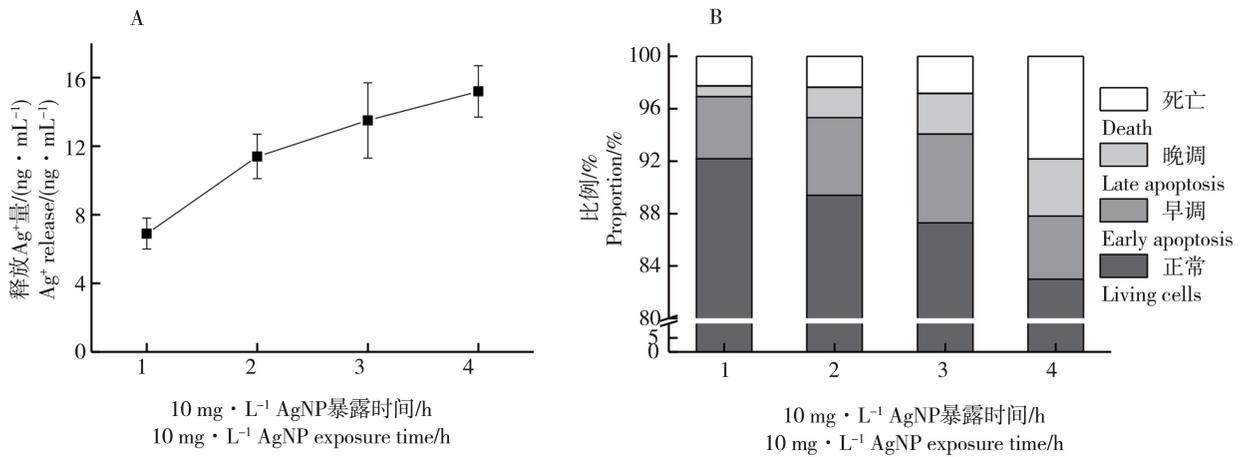


图4 10 mg·L⁻¹纳米银释放银离子量及对大肠杆菌凋亡的影响

注:A为银离子释放动力学;B为大肠杆菌凋亡随时间变化。

Fig. 4 The release of Ag⁺ and the apoptosis of *E. coli* after exposure to 10 mg · L⁻¹ AgNP

Note: A is silver ion release kinetics; B is *E. coli* apoptosis over time.

由于土壤环境微生物众多,不易培养,故选择革兰氏阴性细菌和革兰氏阳性细菌的代表菌株大肠杆菌、金黄色葡萄球菌来分析纳米银的抗菌特性。结果表明,纳米银能够诱导大肠杆菌和金黄色葡萄球菌凋亡来达到抑菌效果。随着暴露时间延长,纳米银释放的银离子增多,大肠杆菌的凋亡率也缓慢增加。虽然释放的银离子较少,但其作用不可忽视。大量研究强调了纳米银释放的 Ag^+ 在诱导生物毒性,尤其是抗菌作用上有着重要的作用^[30-31],在好氧条件下纳米银毒性只与释放出的 Ag^+ 浓度相关^[30]。纳米银溶解引起 Ag^+ 释放到环境中,将会破坏细胞的呼吸链^[32],和巯基或者其他蛋白相结合,抑制参与磷、硫及氮循环细菌的酶活性^[33]。但更多研究认为纳米银本身的毒性大于溶解释放的 Ag^+ ,当纳米银溶解度小于 2.6% 时,纳米银所引起的毒性大于溶解释放银离子的毒性^[34]。细菌与纳米颗粒直接作用,会导致细胞功能和形态学上的改变,如蛋白质的水解、DNA 和 RNA 的降解、细胞收缩,以及细胞碎裂形成凋亡小体等,并最终导致细胞的死亡^[35]。纳米银进入细胞内部会导致膜损伤、氧化应激和死亡率显著增高^[36],活性氧的产生是诱导凋亡的主要原因^[37]。

因此,纳米银和银离子均会对土壤微生物产生影响,但纳米银的毒性一方面是其本身的特异性结果,另一方面是通过缓慢释放银离子来杀菌,但土壤环境复杂,银离子的毒性在短期内强,而纳米银的毒性更具持久性。

综上所述:1) 土壤中添加纳米银后,其可培养微生物数量显著减少,土壤酶活性受到抑制。其中土壤脲酶、过氧化氢酶对纳米银较为敏感,蔗糖酶、FDA 酶受纳米银的影响较小。

2) 银离子对土壤微生物也有一定的毒性,5、10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 银离子显著抑制土壤可培养微生物数量,但银离子对土壤酶活性的影响较小。

3) 纳米银的毒性除了来自其本身的特异抗菌性,也有部分毒性来自缓慢释放的银离子。

通讯作者简介:司友斌(1968-),男,土壤学博士,教授,主要研究方向为环境生物修复技术,发表学术论文 150 余篇。

参考文献 (References):

- [1] Otari S V, Patil R M, Ghosh S J, et al. Intracellular synthesis of silver nanoparticle by actinobacteria and its antimicrobial activity [J]. *Spectrochimica Acta Part A Molecular & Biomolecular Spectroscopy*, 2014, 136: 1175-1180
- [2] Anjum N A, Gill S S, Duarte A C, et al. Silver nanoparticles in soil-plant systems [J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 2013, 15(9): 1-26
- [3] Rico C M, Majumdar S, Duarte-Gardea M. Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2011, 59(8): 3485-3498
- [4] Kahru A, Dubourguier H C, Blinova I, et al. Biotests and biosensors for ecotoxicology of metal oxide nanoparticles: A minireview [J]. *Sensors*, 2008, 8(8): 5153-5170
- [5] 林先贵, 陈瑞蕊, 胡君利. 土壤微生物资源管理、应用技术与学科展望[J]. *生态学报*, 2010, 30(24): 7029-7037
- Lin X G, Chen R R, Hu J L. The management and application of soil microbial resources and the perspectives of soil microbiology [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(24): 7029-7037 (in Chinese)
- [6] Du W, Sun Y, Ji R, et al. TiO_2 and ZnO nanoparticles negatively affect wheat growth and soil enzyme activities in agricultural soil [J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 2011, 13(4): 822-828
- [7] Peyrot C, Wilkinson K J, Desrosiers M, et al. Effects of silver nanoparticles on soil enzyme activities with and without added organic matter [J]. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 2014, 33(1): 115-125
- [8] 王秋双, 戚兴超, 申天琳, 等. 纳米银与石墨烯对土壤微生物及土壤酶的影响[J]. *环境科学学报*, 2017, 37(8): 3149-3157
- Wang Q S, Qi X C, Shen T L, et al. Effect of silver nanoparticles and graphene on soil microorganisms and enzyme activities [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2017, 37(8): 3149-3157 (in Chinese)
- [9] Chen X, Schluesener H J. Nanosilver: A nanoparticle in medical application [J]. *Toxicology Letters*, 2008, 176(1): 1-12
- [10] Liu J Y, Sonshine D A, Shervani S, et al. Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces [J]. *ACS Nano*, 2010, 4(11): 6903-6913
- [11] Morones J R, Elechiguerra J L, Camacho A, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles [J]. *Nanotechnology*, 2005, 16(10): 2346-2353
- [12] Fabrega J, Fawcett S R, Renshaw J C, et al. Silver nanoparticle impact on bacterial growth: Effect of pH, concentration, and organic matter [J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(19): 7285-7290
- [13] 吴源. 纳米银的生物效应及毒性作用机制[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2010: 81-83
- Wu Y. Biological effects of silver nanoparticles and the mechanistic clue for toxicity [D]. Hefei: University of Sci-

- ence and Technology of China, 2010: 81-83 (in Chinese)
- [14] Sharma V K, Yngard R A, Lin Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities [J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2009, 145(1-2): 83-96
- [15] Said J, Dodoo C C, Walker M, et al. An *in vitro* test of the efficacy of silver-containing wound dressings against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in simulated wound fluid [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, 462(1-2): 123-128
- [16] Dwyer D J, Winkler J A. Identification and Characterization of Programmed Cell Death Markers in Bacterial Models [M]. *Necrosis: Humana Press*, 2013: 145-159
- [17] 胡伟, 李越中, 张禹清, 等. 细菌的细胞程序性死亡[J]. *微生物学报*, 2002, 42(2): 255-258
- Hu W, Li Y Z, Zhang Y Q, et al. Programmed cell death in bacteria [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2002, 42(2): 255-258 (in Chinese)
- [18] Xu H, Qu F, Xu H, et al. Role of reactive oxygen species in the antibacterial mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli* O157:H7 [J]. *Biometals*, 2012, 25(1): 45-53
- [19] Fadok V A, Voelker D R, Campbell P A, et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages [J]. *Journal of Immunology*, 1992, 148(7): 2207-2216
- [20] Gottschalk F, Sonderer T, Scholz R W, et al. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions [J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(24): 9216-9222
- [21] Mueller N C, Nowack B. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment [J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(12): 4447-4453
- [22] 李振高, 骆永明, 滕应. 土壤与环境微生物研究法[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 395-419
- Li Z G, Luo Y M, Teng Y. *Soil and Environmental Microbiological Research* [M]. Beijing: Science Press, 2008: 395-419 (in Chinese)
- [23] Kaiser J P, Roesslein M, Diener L, et al. Cytotoxic effects of nanosilver are highly dependent on the chloride concentration and the presence of organic compounds in the cell culture media [J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2017, 15(1): 1-11
- [24] Colman B P, Arnaout C L, Anciaux S, et al. Low concentrations of silver nanoparticles in biosolids cause adverse ecosystem responses under realistic field scenario [J]. *Plos One*, 2013, 8(2): e57189
- [25] Kumar N, Shah V, Walker V K. Perturbation of an arctic soil microbial community by metal nanoparticles [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 190(1-3): 816-822
- [26] Masrahi A, Vandevort A R, Arai Y. Effects of silver nanoparticle on soil-nitrification processes [J]. *Archives of Environmental Contamination & Toxicology*, 2014, 66(4): 504-513
- [27] Yang Y, Quensen J, Mathieu J, et al. Pyrosequencing reveals higher impact of silver nanoparticles than Ag⁺ on the microbial community structure of activated sludge [J]. *Water Research*, 2014, 48: 317-325
- [28] Kraas M, Schlich K, Knopf B, et al. Long-term effects of sulfidized silver nanoparticles in sewage sludge on soil microflora [J]. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 2017, 36(12): 3305-3313
- [29] Starnes D L, Lichtenberg S S, Unrine J M, et al. Distinct transcriptomic responses of *Caenorhabditis elegans* to pristine and sulfidized silver nanoparticles [J]. *Environmental Pollution*, 2016, 213: 314-321
- [30] Xiu Z M, Zhang Q B, Puppala H L, et al. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles [J]. *Nano Letters*, 2012, 12(12): 4271-4275
- [31] Benn T M, Westerhoff P. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics [J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(11): 4133-4139
- [32] Sedlak R H, Hnilova M, Grosh C, et al. Engineered *Escherichia coli* silver-binding periplasmic protein that promotes silver tolerance [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2012, 78(7): 2289-2296
- [33] Lee Y J, Kim J, Oh J, et al. Ion-release kinetics and ecotoxicity effects of silver nanoparticles [J]. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 2012, 31(1): 155-159
- [34] Beer C, Foldbjerg R, Hayashi Y, et al. Toxicity of silver nanoparticles—Nanoparticle or silver ion? [J]. *Toxicology Letters*, 2012, 208(3): 286-292
- [35] Budd R C. Activation-induced cell death [J]. *Current Opinion in Immunology*, 2001, 13(3): 356-362
- [36] Min J S, Kim K S, Kim S W, et al. Effects of colloidal silver nanoparticles on sclerotium forming phytopathogenic fungi [J]. *Plant Pathology Journal*, 2009, 25(4): 376-380
- [37] Buttke T M, Sandstrom P A. Oxidative stress as a mediator of apoptosis [J]. *Immunology Today*, 1994, 15(1): 7-10
- ◆