

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20200403001

丁文东, 崔康平, 郭志, 等. 纳米银在诺氟沙星胁迫下对黄孢原毛平革菌的毒物兴奋效应[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(6): 141-150

Ding W D, Cui K P, Guo Z, et al. Hormesis of silver nanoparticles on *Phanerochaete chrysosporium* under norfloxacin stress [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(6): 141-150 (in Chinese)

纳米银在诺氟沙星胁迫下对黄孢原毛平革菌的毒物兴奋效应

丁文东^{1,2}, 崔康平^{1,2}, 郭志^{1,2,*}, 高斯研^{1,2}

1. 合肥工业大学资源与环境工程学院, 合肥 230009

2. 合肥工业大学纳米矿物与污染控制安徽普通高校重点实验室, 合肥 230009

收稿日期: 2020-04-03

录用日期: 2020-05-20

摘要: 具有生物毒性的纳米银(AgNPs)在低浓度下能产生毒物兴奋效应, 可以刺激细胞的活性增强。研究了在诺氟沙星胁迫下, AgNPs 对黄孢原毛平革菌活性的影响, 并通过探究 AgNPs 的迁移转化以及细胞外蛋白质浓度的变化, 结合扫描电镜、X 射线衍射以及傅里叶红外光谱分析进行机理探索。结果表明, AgNPs 在 $0.001 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下可以将黄孢原毛平革菌的细胞活性提高 1.29 倍与 1.51 倍, 而在 $1.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AgNPs 的刺激下, 细胞活性降低 64%, 同时, 相同浓度的 Ag 离子仅对细胞产生毒性抑制作用。低浓度 AgNPs 可以在溶液相与生物相之间进行迁移, 触发细胞生物学特性的变化, 刺激细胞在面临诺氟沙星胁迫时产生较多的胞外蛋白质来减轻毒性抑制作用。黄孢原毛平革菌的菌丝表面存在的羟基、醛、酮和巯基等官能团可以将 Ag 离子还原为纳米氯化银和硫化银, 在细胞表面聚集。

关键词: 纳米银; 诺氟沙星; 黄孢原毛平革菌; 毒物兴奋效应

文章编号: 1673-5897(2020)6-141-10

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

Hormesis of Silver Nanoparticles on *Phanerochaete chrysosporium* under Norfloxacin Stress

Ding Wendong^{1,2}, Cui Kangping^{1,2}, Guo Zhi^{1,2,*}, Gao Siyan^{1,2}

1. School of Resources and Environmental Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China

2. Key Laboratory of Nano Minerals and Pollution Control of Anhui Higher Education Institutes, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China

Received 3 April 2020

accepted 20 May 2020

Abstract: Low concentrations of silver nanoparticles (AgNPs) with biological toxicity can produce hormesis and stimulate the activity of cells. The effect of AgNPs on the activity of *Phanerochaete chrysosporium* was studied under the stress of norfloxacin. The mechanism was explored by investigating the migration and transformation of AgNPs as well as the concentration change of extracellular protein, combined with scanning electron microscope

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51809068); 国家重点研发计划资助项目(SQ2019YFC040023); 安徽省科技重大专项(17030801031); 安徽省科技重大专项(201903a07020009); 长丰县-合肥工业大学产业创新引导资金资助项目; 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(JZ2020HGTB0022, JZ2018HGBZ0311)

第一作者: 丁文东(1994—), 男, 硕士研究生, 研究方向为环境微生物学, E-mail: hfutding@163.com

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

(SEM), X-ray diffraction (XRD), and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The results showed that the cell activity of *Phanerochaete chrysosporium* increased by 1.29 and 1.51 times as the concentrations of AgNPs were $0.001 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; it decreased by 64% when the concentration was $1.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. And the same concentration of Ag ion could only inhibit cell activity. Low concentration of AgNPs can migrate between the solution phase and the biological phase, thus triggering the change of biological characteristics of cells, and stimulating cells to produce more extracellular proteins under the stress of norfloxacin to reduce toxicity inhibition. The functional groups such as hydroxyl group, aldehyde group, ketone group, and sulfhydryl group on the mycelial surface of *Phanerochaete chrysosporium* can reduce silver ions to AgCl-NPs and AgS-NPs, which can aggregate on the cell surface.

Keywords: silver nanoparticles; norfloxacin; *Phanerochaete chrysosporium*; hormesis

长期以来,纳米银(AgNPs)被广泛应用和研究。由于纳米材料具有小尺寸、宏观量子隧道和量子尺寸等效应,使得它们在生物学、医学和生物化学工程中的应用正在迅速扩展,并展现出其独特的环境效应和生物毒性^[1-2]。然而,最近的研究结果表明,AgNPs 并不总是起杀菌作用,低浓度的 AgNPs 会产生毒物兴奋效应,刺激微生物的生长。AgNPs 浓度在最低致死浓度的 12% ~ 31% 时能够对大肠杆菌产生毒物兴奋效应^[3]。人纤维肉瘤细胞系 HT-1080 的活性在 AgNPs 浓度为 $0.78 \sim 6.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时被刺激,在浓度 $\leq 0.39 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $\geq 12.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时被抑制^[4]。同样,外周血淋巴细胞(PBMCs)和精原干细胞系 C18-4 的活性也会随 AgNPs 浓度的变化产生低浓度刺激、高浓度抑制的现象^[5-6]。毒物兴奋效应(Hormesis)最初起源于毒理学,超过一定范围的高剂量有毒因子可能对生物体有害,而一定范围内的低剂量有毒因子可能对生物体有益,刺激微生物生长。目前,AgNPs 的“毒物兴奋效应”机理尚不清楚,有待进一步研究。

诺氟沙星(NOR)是废水中常见的氟喹诺酮类药物^[7]。抗生素对微生物降解有很强的抵抗力,由于其强吸附特性,可能会在水中持续存在^[8]。环境中存在的抗菌化合物令人担忧,主要是因为长期暴露在亚治疗剂量下可能会为微生物提供选择性压力^[9]。在环境中检测到的氟喹诺酮类药物(环丙沙星、诺氟沙星和氧氟沙星)最大浓度可达到 $7\ 560 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[10]。这些化合物会破坏水中重要的生物过程,并对水生和陆生生物构成潜在威胁,是环境中的重要毒性胁迫来源^[11]。

黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)是一种典型的白腐真菌菌株,具有降解有机污染物的功能,是水处理过程中常用的微生物,所以本研究选择其作为受试微生物。通过不同浓度 AgNPs 对

诺氟沙星胁迫下的黄孢原毛平革菌存活率影响的比较,监测刺激过程中溶液中总银浓度的变化以及细胞外蛋白质含量的变化,并借助扫描电镜、X 射线衍射和傅里叶红外光谱分析菌丝球表面的变化,从而探究 AgNPs 产生毒物兴奋效应的原因。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验材料

黄孢原毛平革菌 AF-96007 菌株购于中国典型培养物保藏中心(武汉),并保持在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下储存在马铃薯葡萄糖琼脂培养基中,通过将孢子刮到灭菌的超纯水中,将悬浮液的浓度调节至 $2.0 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。然后将孢子悬浮液接种到液体培养基中,在 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的培养箱中培养 3 d。其中,马铃薯葡萄糖琼脂培养基:马铃薯提取物 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,葡萄糖 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,琼脂 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,维生素 B_1 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。液体培养基:酒石酸铵 $0.211 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,葡萄糖 $11.098 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, CaCl_2 $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NaAc $1.641 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,维生素溶液 0.5 mL ,无机盐溶液 1 mL 。所有培养基使用前均在 $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 湿热灭菌 30 min。诺氟沙星和 AgNO_3 纯度均 > 98%,购自 Sigma-Aldrich(上海)有限公司,所用其他化学品均为分析纯,由国药化学试剂有限公司提供。

1.2 AgNPs 的制备与表征

参照本课题组之前使用的制备方法^[12]。在冰浴下,将 4 mL 质量分数为 0.3% 的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)溶液、 12 mL $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硼氢化钠溶液与 233 mL 水混合,然后加入 5 mL 的 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AgNO_3 溶液,室温搅拌反应 2 h;用 1 kDa 透析袋,将所得颗粒悬浮液用超纯水透析,去除多余的 PVP 和 Ag 离子,即获得 PVP-AgNPs 的分散液,于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中储存备用。

本研究采用火焰石墨炉原子吸收分光光度计(AAnalyst 800, PE 公司, 美国)测定了所制备的 Ag-NPs 的浓度, 并利用紫外可见分光光度计(UV-2550, 岛津公司, 日本)、Zeta 电位仪(Nano-ZS90, Malvern 公司, 英国)来表征所合成的银纳米材料的紫外可见吸收峰、流体动力学直径和表面电荷。

1.3 AgNPs 对诺氟沙星胁迫下的真菌存活率实验

培养 3 d 后的黄孢原毛平革菌菌丝球在 $10\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 并用 $2\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}\ \text{NaHCO}_3$ 缓冲液清洗 2 遍, 等量的菌丝球(0.5 g)分装到各个试管中。将菌丝球进行以下 3 组处理。(1)诺氟沙星胁迫组: 分别加入诺氟沙星, 使实验溶液中的诺氟沙星浓度为 0、1、5、10 和 $20\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; (2)AgNPs 处理组: 在 $5\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 诺氟沙星的胁迫下, 分别加入 AgNPs, 使试验溶液中的 AgNPs 浓度为 0、0.001、0.01、0.13 和 $1.3\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; (3)AgNO₃ 处理组: 在 $5\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 诺氟沙星的胁迫下, 分别加入 AgNO₃, 使试验溶液中的 AgNO₃ 浓度为 0、0.001、0.01、0.13 和 $1.3\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。染毒 24 h 后, 采用 MTT 比色法^[13], 测定反应后的上清液在 534 nm 处的吸光度, 并以与对照组的相对百分比表示黄孢原毛平革菌的存活率。

1.4 胞外蛋白质浓度测定

实验中, 取 2 mL 样品于离心管中, 在 $5\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速下离心 15 min, 然后取出 1 mL 上清液用于胞外蛋白的测定。在该 1 mL 样品中加入 5 mL 考马斯亮兰染色液试剂, 混匀, 室温静置 3 min 后, 于波长 595 nm 处比色, 读取吸光度, 由样品的吸光度值查标准曲线即可求出蛋白质的含量。

1.5 溶液中总银浓度测定

为了解 AgNPs 以及 Ag 离子在体系中的迁移转化, 需要在 AgNPs 与 Ag 离子对黄孢原毛平革菌的活性影响实验中取出样品来测定总银浓度, 在测定之前, 将从各个时间点取出的试样利用硝酸和过氧化氢进行消解^[14], 再采用电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS)(Agilent 7500, 安捷伦科技(中国)有限公司, 美国)对溶液中的总银进行定量分析。

1.6 菌丝球表面分析

对正常培养组(空白组)、 $5\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 诺氟沙星胁迫组(对照组)、 $5\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 诺氟沙星以及 $1.1\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AgNO₃ 胁迫组(Ag 离子处理组)、 $5\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 诺氟沙星以及 $0.01\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AgNPs 胁迫组(AgNPs 处理组)中的黄孢原毛平革菌菌球, 分别进行扫描电镜及能谱分析(FEI Quanta-400, Fei 公司, 荷兰)、X 射线衍射

分析(D8 Discover-2500, Bruker 公司, 德国)以及傅里叶红外光谱分析(WQF-410, 北京瑞利分析仪器公司, 中国)。

2 结果(Results)

2.1 AgNPs 的表征

由图 1(a)可知, 所制备的 PVP-AgNPs 在波长为 397 nm 处有较强的特征吸收峰, 这一结果与此前合成的 AgNPs 的结果一致^[12]。且 PVP-AgNPs 在 $2\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}\ \text{NaHCO}_3$ 缓冲液中测定的 Zeta 电位是 $(-17.8 \pm 0.6)\ \text{mV}$, 动态光散射仪测出的氢动力学粒径是 $(76.4 \pm 5.6)\ \text{nm}$ 。由图 1(b)可知, 合成的 AgNPs 粒径分布范围较广, 可能是由于 AgNPs 之间发生了团聚。此外, 经火焰原子吸收光谱法检测, 所得分散液中, PVP-AgNPs 的浓度为 $18.38\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($0.17\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

2.2 黄孢原毛平革菌活性分析

由图 2(a)所示, 在诺氟沙星处理组中, 随着诺氟沙星胁迫浓度的增加, 细胞活性逐渐降低。由图 2(b)所示, 在 AgNO₃ 处理组中, 细胞活性也同样随着 Ag 离子浓度的升高呈现降低趋势, 这与诺氟沙星单独胁迫的情况相似, Ag 离子浓度在 $0.13\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.3\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 细胞活性稳定于 29%, 与对照组的 55% 相比, 活性降低 47%, 可能由于在较高浓度毒物刺激下真菌可以利用诺氟沙星作为碳源和能源抵御环境中的不利因素^[15], 导致其活性不再降低。

如图 2(c)所示, 较高浓度的 AgNPs ($0.13\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.3\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理组中, 由于 AgNPs 以及诺氟沙星的毒性胁迫作用, 导致黄孢原毛平革菌的细胞活性明显降低, 最低仅为 20%, 与对照组相比, 活性降低 64%。而在 $0.001\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.01\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, AgNPs 明显刺激了黄孢原毛平革菌的细胞活性, 分别提高到 71% 和 83%, 即活性分别提高 1.29 倍与 1.51 倍, 这表明, AgNPs 的这种毒物兴奋效应刺激黄孢原毛平革菌对环境中的不利因素做出抗性反应。

2.3 胞外蛋白浓度的变化

AgNO₃ 处理后的胞外蛋白质浓度的变化情况如表 1 所示, 与空白组对比分析, Ag 离子的刺激致使胞外蛋白浓度出现不同程度的降低, 且当 AgNO₃ 浓度从 $0.01\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加到 $6.5\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 胞外蛋白质浓度逐渐降低, 说明 Ag 离子的增加导致胞外蛋白的消耗, 同时表明 Ag 离子浓度的增加对黄孢原毛平革菌的毒性增加。而对于 AgNPs 处理组, 如表 2 所示, 胞外蛋白质的浓度在较低浓度 AgNPs 的刺激

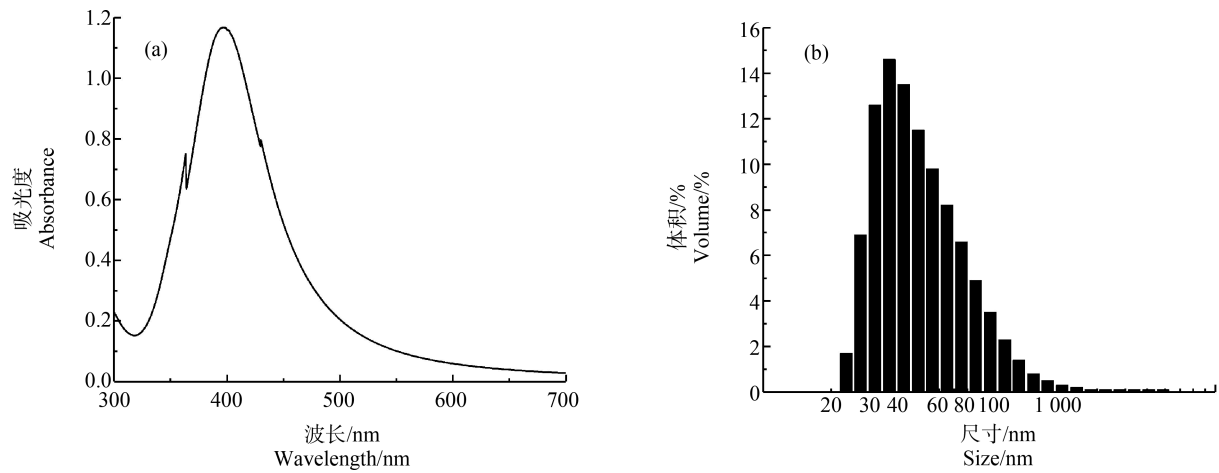


图1 纳米银 (AgNPs) 的表征: (a) AgNPs 的紫外可见吸收光谱; (b) AgNPs 流体动力学平均直径分布直方图

Fig. 1 Characterization of synthesized Ag nanoparticles (AgNPs):

(a) UV-Vis absorption spectrum of AgNPs; (b) histogram of hydrodynamic diameter distribution of AgNPs

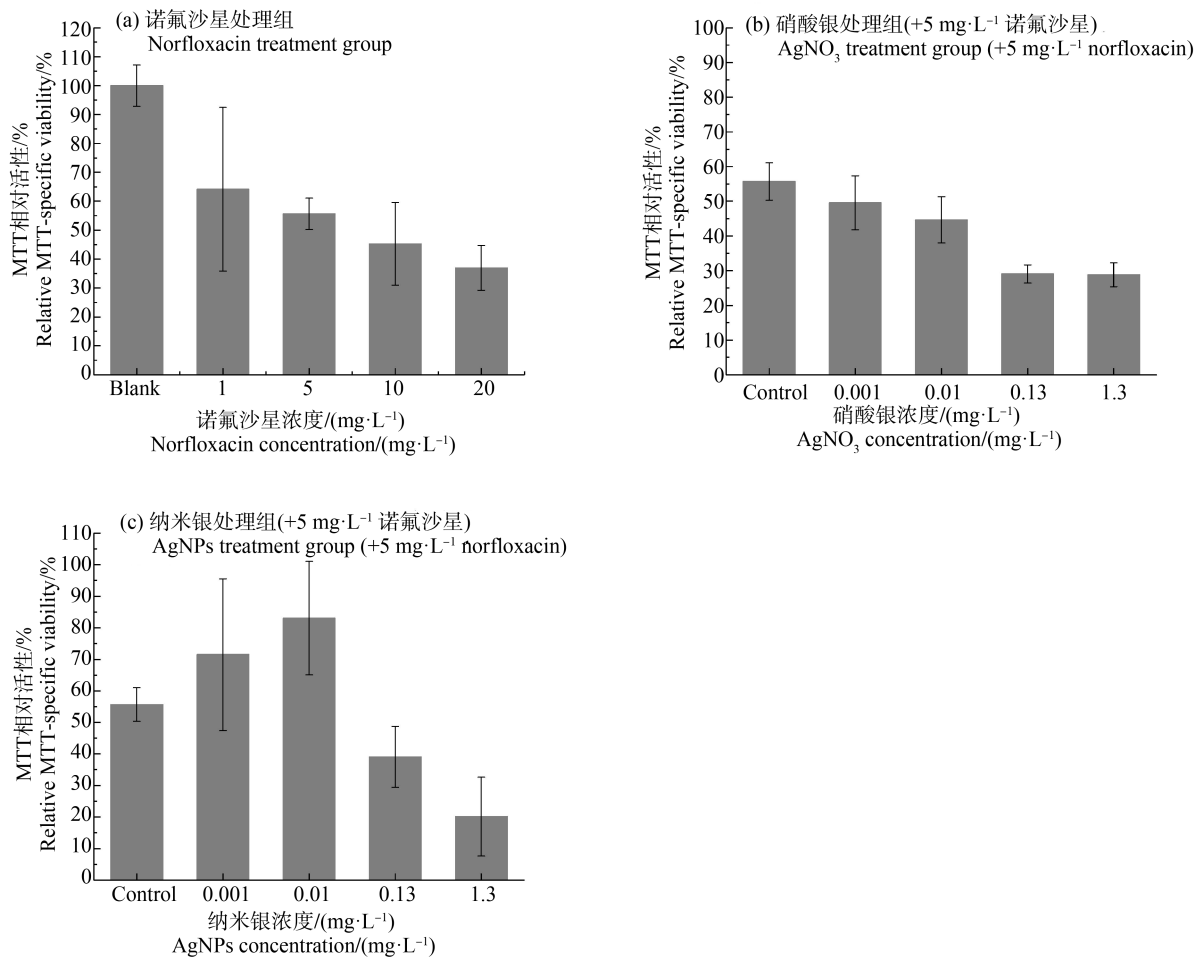


图2 不同暴露组对黄孢原毛平革菌活性的影响

注:空白组为正常培养组,对照组为 5 mg·L⁻¹ 诺氟沙星胁迫组。

Fig. 2 Effects of different groups of exposure on the cell viability of *Phanerochaete chrysosporium*

Note: Blank is normal cultured group; control is 5 mg·L⁻¹ norfloxacin stress group.

下(0.001 ~ 0.01 mg·L⁻¹)大部分高于对照组,这表明,低浓度 AgNPs 在外界胁迫下可以刺激细胞产生较多的胞外蛋白质。在较高 AgNPs 浓度的刺激下,相比于同浓度的 Ag 离子处理组,胞外蛋白质随时间的增加消耗更多。

2.4 溶液中总银浓度的变化

如图 3(a)所示,对于所有的实验组,溶液中总银浓度在前 12 h 大体呈现出降低的趋势,这表明,AgNPs 和其他形式的银从溶液相迁移至生物相,且它们迁移得非常迅速,这可能是 AgNPs 会与黄孢原毛平革菌表面产生的生物大分子发生络合作用或者与官能团结合,从而使溶液中总银浓度下降^[16]。而在 12 h 后,溶液中总银浓度的变化差异性较大,在 1.3 mg·L⁻¹ AgNPs 的刺激下,其所有形式的银继续从溶液相迁移至生物相,导致溶液中总银浓度缓慢下降,在 108 h 后的总银浓度降至初始浓度的 3%。在 0.001、0.01 和 0.13 mg·L⁻¹ AgNPs 的刺激下,其所有形式的银反而从生物相迁移至溶液相,引起溶液中总银浓度较快上升,并且初始浓度越低这种变化的趋势越明显,在 108 h 后总银浓度为初始浓度的

84%、68% 和 43%。

如图 3(b)所示,AgNO₃ 初始浓度从 0.001 mg·L⁻¹ 增加至 1.3 mg·L⁻¹,黄孢原毛平革菌对溶液中总银的去除均达到 95% 以上。可以发现,在开始的 12 h 内,溶液中的总银浓度基本上达到最低,而随着 AgNO₃ 浓度的增大,吸附的速度越快,这种增加的趋势可能是由于 AgNO₃ 浓度的增加使之有更大的驱动力克服黄孢原毛平革菌与液相之间的传质阻力,使得黄孢原毛平革菌与 Ag 离子之间的碰撞几率更高,Ag 离子更容易渗透到吸附位点,从而促进了总银的吸附^[15]。

2.5 扫描电镜的表征

由图 4(a)可知,空白组中黄孢原毛平革菌的菌丝相互交织成网状结构,且菌球表面的菌丝光滑、干净,没有任何颗粒状物质附着在菌丝上,菌丝间有间隙,这样的结构有利于其对 AgNPs 的束缚。如图 4(b)所示,对照组明显可见黄孢原毛平革菌的菌丝断裂和菌球破裂,表面粘附有少量分泌物质,表明黄孢原毛平革菌的细胞受到诺氟沙星的严重损伤。如图 4(c)所示,用低剂量 AgNPs 处理后的菌丝体的菌

表 1 不同浓度硝酸银 (AgNO₃) 对细胞外蛋白浓度的影响

硝酸银浓度/(mg·L ⁻¹)	0.5 h	1 h	2 h	3 h	4 h	12 h	24 h	48 h	72 h
AgNO ₃ concentration/(mg·L ⁻¹)									
0	0.802	0.864	0.872	0.857	0.728	0.879	0.782	0.702	0.737
0.001	0.762	0.815	0.836	0.809	0.799	0.787	0.768	0.749	0.763
0.01	0.798	0.803	0.766	0.837	0.812	0.792	0.783	0.722	0.729
0.13	0.729	0.794	0.749	0.693	0.739	0.692	0.689	0.729	0.682
1.3	0.749	0.758	0.842	0.820	0.794	0.723	0.739	0.748	0.723
6.5	0.696	0.729	0.782	0.723	0.725	0.794	0.736	0.729	0.698

表 2 不同浓度 AgNPs 对细胞外蛋白浓度的影响

		(μg·mL ⁻¹)								
AgNPs 浓度/(mg·L ⁻¹)		0.5 h	1 h	2 h	3 h	4 h	12 h	24 h	48 h	72 h
AgNPs concentration/(mg·L ⁻¹)										
0.001		0.832	0.793	0.776	0.802	0.816	0.763	0.758	0.732	0.718
0.01		0.849	0.893	0.973	0.823	0.870	0.876	0.863	0.857	0.814
0.13		0.820	0.843	0.826	0.927	0.827	0.796	0.749	0.852	0.759
1.3		0.727	0.723	0.745	0.776	0.739	0.701	0.685	0.672	0.653
3.2		0.749	0.698	0.669	0.649	0.702	0.731	0.673	0.651	0.639
6.5		0.737	0.759	0.643	0.678	0.652	0.679	0.669	0.652	0.623

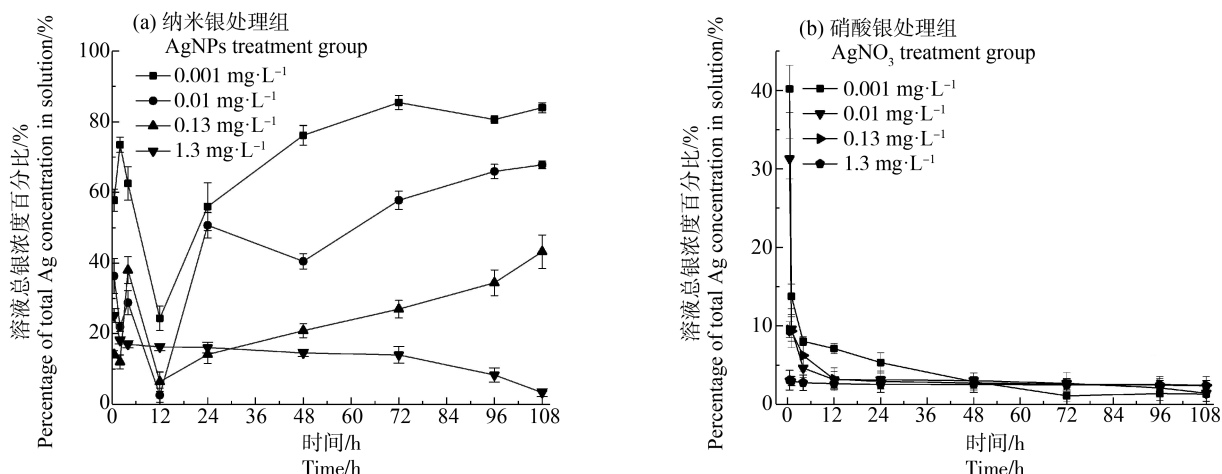


图3 不同暴露组溶液中总银浓度的变化

Fig. 3 The total Ag concentration in solution in different exposure groups

丝体表面散落着少量的颗粒状物质,部分 AgNPs 可通过细胞膜进入细胞。根据能谱分析(图 4(e)),确定菌丝表面的这些纳米级别的颗粒物是与含硫蛋白质结合的 AgNPs。如图 4(d)所示,在 AgNO₃ 处理组中,黄孢原毛平革菌菌丝体表面附着着大量的晶体颗粒,根据能谱分析(图 4(f)),这些颗粒为纳米级的氯化银和硫化银。

2.6 X 射线衍射分析

由图 5(b)可知,AgNO₃ 处理组展示出强烈的 X 射线衍射(XRD)峰,这些 2 倍衍射角值分别隶属于合成纳米氯化银晶体(111), (200), (220), (311), (222) 和(400)晶面的特征衍射信号。反观 AgNPs 处理组(图 5(a)),并没有发现明显的硫化银晶体晶面的特征衍射信号,但是扫描电镜的能量色散 X 射线光谱(EDX)分析中可明显看出有 S 元素存在,由此推测,菌丝表面的含硫基团并不能有效的束缚住 AgNPs, AgNPs 可从生物相转移至液相。此外,经 AgNPs 处理后黄孢原毛平革菌表面的 XRD 图像显示,在 20° 左右有明显的衍射峰,这可能是由于合成的 AgNPs 微晶结构的无序排列^[17],这表明,低浓度的 AgNPs 在黄孢原毛平革菌和诺氟沙星共存体系中形成一种典型的非晶态材料,这种无定形状态可能也是 AgNPs 进出细胞的原因。

2.7 傅里叶红外变换光谱分析

如图 6 所示,对比对照组和 AgNO₃ 处理组,发现光谱基本重合,可能由于 Ag 离子对于真菌表面的官能团刺激不明显或过于强烈直接使真菌死亡。在 3 500 ~ 3 300 cm⁻¹ 范围内,N—H 的伸缩振动可

能与羧基的宽伸缩振动峰重合^[18],在 3 300 cm⁻¹ 区域附近的峰显示了叠加在—NH 拉伸带上的羧基的强烈宽—OH 拉伸振动,黄孢原毛平革菌表面的—NH 和羧基都能为 Ag 离子提供更多的结合位点。而 AgNPs 处理组,在 3 433 cm⁻¹ 处多出一个峰,为典型的羧基吸收峰^[19],可能由于 AgNPs 刺激真菌表面产生羧基并与之结合,—OH 拉伸也可能参与 Ag 离子到 Ag⁰ 的还原^[20]。在 2 854 cm⁻¹ 和 2 925 cm⁻¹ 处观察到的吸收峰与真菌蛋白质上碳氢化合物 CH₂ 基团的对称和不对称拉伸振动有关^[21]。AgNPs 处理后,峰值由 2 348 cm⁻¹ 移动到 2 362 cm⁻¹ 并且在 2 140 cm⁻¹ 出现一个新峰,表明存在—PH 以及—C=C=O^[22],可能由于其在参与 AgNPs 的迁移转化过程中,在 1 554 cm⁻¹ 和 1 318 cm⁻¹ 处的峰发生了相对偏移,分别代表 N=O 摆动以及羧酸二聚体中的 C—O 伸缩振动,在 1 655 cm⁻¹ 和 1 037 cm⁻¹ 处出现的峰属于从芳香胺和脂肪族胺伸展出来的酰胺和 CN 的振动,而在 410 ~ 839 cm⁻¹ 出现的一系列峰代表细胞壁结构中的 P—S 或 P—S—P 伸缩振动,在加入 AgNPs 后这些峰大多消失,可能由于细胞壁结构中的 S 与 AgNPs 结合,体系中的 AgNPs 很可能取代 S 的位点,从而附着在黄孢原毛平革菌菌丝表面,刺激真菌产生毒物兴奋效应。

3 讨论 (Discussion)

在一定范围内(0.001 ~ 0.01 mg·L⁻¹)的低剂量 AgNPs 不会对细胞产生不利影响,反而会增强细胞活性,抵抗环境中不利因素诺氟沙星的胁迫。AgNPs 的这种毒物兴奋效应可能是由于低浓度激活了

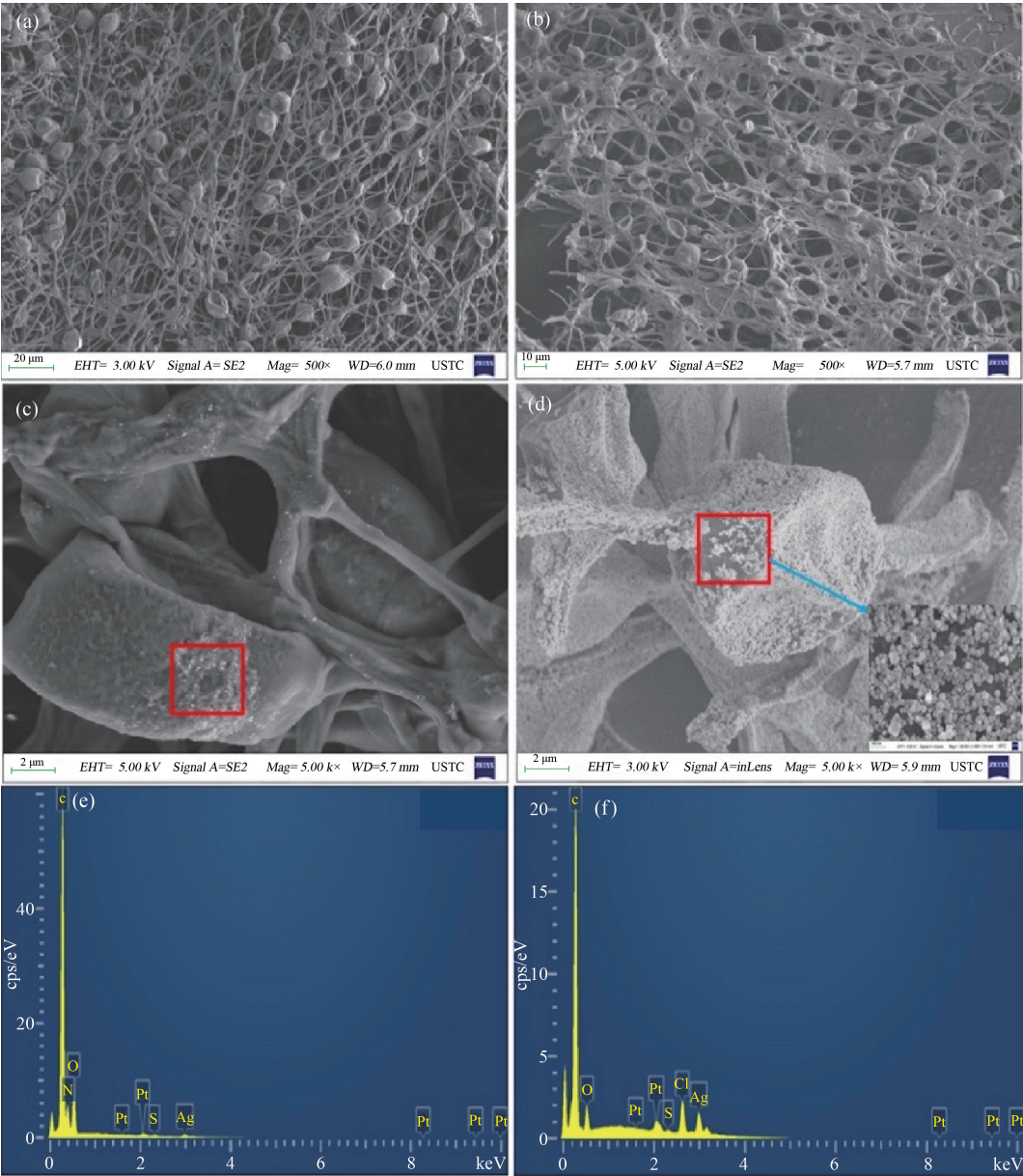


图 4 黄孢原毛平革菌表面的扫描电镜 (SEM) 图和能量色散 X 射线光谱 (EDX) 分析

注:(a)空白组;(b)对照组;(c)AgNPs 处理组;(d)AgNO₃ 处理组;(e)为(c)图中标记区域的 EDX;(f)为(d)图中标记区域的 EDX。

Fig. 4 The scanning electron microscope (SEM) micrographs and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) analysis of *Phanerochaete chrysosporium* surfaces

Note: (a) blank group; (b) control group; (c) AgNPs treatment group; (d) AgNO₃ treatment group; (e) EDX of denoted area in (c); (f) EDX of denoted area in (d).

毒性损伤的修复机制,这种修复过程可能对毒物的暴露进行过度补偿,从而导致细胞活性显著增加^[23]。AgNO₃ 处理组中,Ag 离子浓度的增加使得黄孢原毛平革菌在诺氟沙星的胁迫下活性降低,高浓度的 AgNPs 可能也是通过氧化溶解释放出大量 Ag 离子从而对细胞产生抑制作用。

由于 Ag 离子以及诺氟沙星的毒性随着暴露时

间的增加而增强,使细胞产生较多的胞外蛋白质保护细胞免受损伤,但在随后的时间里,胞外蛋白质可被黄孢原毛平革菌用作氮源而被消耗^[15],使得其浓度随着暴露时间的增加而降低。AgNPs 可以触发细胞生物学特性的变化,从而影响细胞的吸收和生物活性。此外,它们会引起结合蛋白的结构、功能和亲和力的变化^[24],从而促使黄孢原毛平革菌更好地

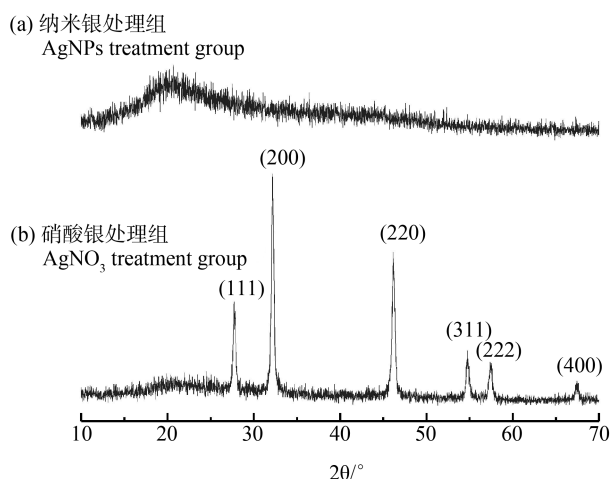


图5 AgNO_3 和 AgNPs 处理后黄孢原毛平革菌样品的 X 射线衍射 (XRD) 图谱

Fig. 5 X-ray diffraction (XRD) pattern of *Phanerochaete chrysosporium* sample impregnated with AgNPs and AgNO_3

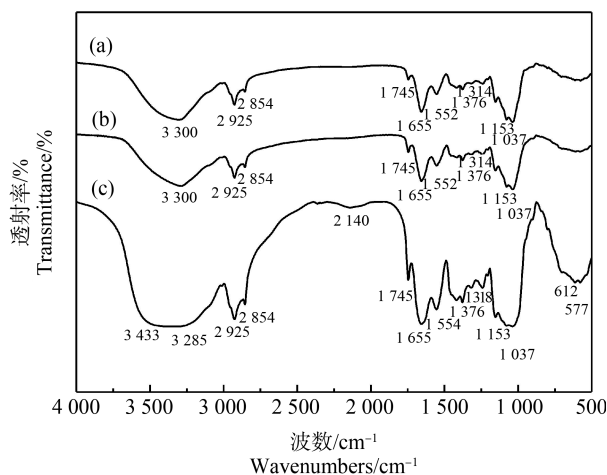


图6 (a) 对照组、(b) AgNO_3 处理组和 (c) AgNPs 处理组中黄孢原毛平革菌的傅里叶红外变换光谱 (FTIR) 图

Fig. 6 The Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) spectra of (a) control, (b) AgNO_3 -treated and (c) AgNPs -treated *Phanerochaete chrysosporium*

应对环境中毒性物质的胁迫。研究表明, AgNPs 可以通过与蛋白质相互作用来减轻抑制作用, 胞外蛋白质中含有羟基、氨基和羧基等多个官能团, 这些官能团可以通过静电斥力、空间位点以及溶剂化力与 AgNPs 相互作用^[25]。 AgNPs 通过释放 Ag 离子产生毒性^[26], 从而刺激真菌细胞产生更多的含硫蛋白质和相关基团对环境中的 Ag 离子进行吸附结合, 进而消耗胞外蛋白。

在水生系统中, 真菌表面的有机物质能通过影

响 AgNPs 的理化性质, 改变其聚集沉降状态, 从而影响着 AgNPs 在环境中的迁移转化、生物利用度及生物毒性等^[27]。 AgNPs 可以通过胞吞作用积极地进入细胞^[28], 使其从溶液相进入生物相, 又由于低剂量 AgNPs 浓度远低于致死量反而刺激黄孢原毛平革菌将毒性物质排出胞外, 使得 AgNPs 又从生物相进入溶液相, 最终维持一个较为稳定的水平, 较好地抵御外部不利因素。

黄孢原毛平革菌表面所分泌的羟基、醛、酮和巯基等官能团能为 Ag 离子提供还原位点^[29], 使 Ag 离子转化为纳米硫化银和纳米氯化银, 由于膜屏障的作用, 这些 AgNPs 颗粒在菌丝体上积累, 并包覆住整个菌丝体, 同时也验证了溶液中所有形式的银确实从溶液相迁移到黄孢原毛平革菌的菌丝表面。

综上所述, 本研究表明:

(1) AgNPs 对诺氟沙星胁迫下的黄孢原毛平革菌活性具有低浓度刺激、高浓度抑制作用。 AgNPs 在 $0.001 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下可以将黄孢原毛平革菌的细胞活性分别提高 1.29 倍与 1.51 倍, 而在 $1.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AgNPs 的刺激下, 细胞活性降低 64%。相同浓度的 Ag 离子仅对细胞产生毒性抑制作用。

(2) 黄孢原毛平革菌利用并消耗其表面的蛋白质来应对 Ag 离子产生的毒性。低浓度 AgNPs 可以触发细胞生物学特性的变化, 刺激细胞在面临诺氟沙星胁迫时产生较多的胞外蛋白质, 从而促使黄孢原毛平革菌更好地应对环境中毒性物质的胁迫。

(3) 通过扫描电镜以及能谱分析, 并结合 XRD 和傅里叶红外变换光谱分析, 低剂量 AgNPs 可在溶液相与生物相之间进行迁移, 其晶体在细胞表面呈无定形状态。黄孢原毛平革菌的菌丝表面存在的羟基、醛、酮和巯基等官能团能为环境中 Ag 离子提供还原位点, 还原成纳米硫化银和纳米氯化银颗粒, 其被阻挡在细胞外, 包覆住菌丝体。

AgNPs 的迁移转化以及刺激胞外蛋白质的产生让我们对毒物兴奋效应有了更深刻的认识, 并且让我们在应用 AgNPs 时, 需要对低浓度 AgNPs 抗菌性重新审视, 当 AgNPs 作为污染物进入环境时, AgNPs 对抗生素诺氟沙星的抗菌性的影响也需要重新考量。此外, 在此基础上有必要进一步探究低浓度 AgNPs 对水环境中残余抗生素的处理效果, 为开发一种抗生素污染物的生物处理方法提供新思路。

通讯作者简介:郭志(1990—),男,博士,副教授,主要研究方向为生态污染修复和生态毒理学。

参考文献 (References):

- [1] 卢雪蓉, 冯晓丽, 刘朝莹, 等. 纳米银的迁移转化对环境微生物毒性的影响[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(5): 49-57
Lu X R, Feng X L, Liu Z Y, et al. Impact of migration and transformation of AgNPs on its toxicity towards environmental microorganism [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2018, 13(5): 49-57 (in Chinese)
- [2] 衣俊, 黄俊, 程金平. 纳米银在水环境中的环境行为和毒性效应研究进展[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(1): 101-109
Yi J, Huang J, Cheng J P. Review of environmental behavior and toxicity of silver nanoparticles in the aquatic environment [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2015, 10(1): 101-109 (in Chinese)
- [3] Xiu Z M, Zhang Q B, Puppala H L, et al. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles [J]. Nano Letters, 2012, 12(8): 4271-4275
- [4] Arora S, Jain J, Rajwade J M, et al. Cellular responses induced by silver nanoparticles: *In vitro* studies [J]. Toxicology Letters, 2008, 179(2): 93-100
- [5] Shin S H, Ye M K, Kim H S, et al. The effects of nano-silver on the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells [J]. International Immunopharmacology, 2007, 7(13): 1813-1818
- [6] Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager J J, et al. *In vitro* cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells [J]. Toxicological Sciences, 2005, 88(2): 412-419
- [7] Li H B, Chen J, Hou H J, et al. Sustained molecular oxygen activation by solid iron doped silicon carbide under microwave irradiation: Mechanism and application to norfloxacin degradation [J]. Water Research, 2017, 126: 274-284
- [8] González-Plaza J J, Blau K, Milaković M, et al. Antibiotic-manufacturing sites are hot-spots for the release and spread of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in receiving aquatic environments [J]. Environment International, 2019, 130: 104735
- [9] Kivits T, Broers H P, Beeltje H, et al. Presence and fate of veterinary antibiotics in age-dated groundwater in areas with intensive livestock farming [J]. Environmental Pollution, 2018, 241: 988-998
- [10] Zhang Q Q, Ying G G, Pan C G, et al. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: Source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance [J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(11): 6772-6782
- [11] 汪皓琦, 董玉璞, 汪灵伟, 等. 4 种喹诺酮类抗生素对发光菌毒性作用研究[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(3): 453-459
Wang H Q, Dong Y Y, Wang L W, et al. The toxicity of four quinolones to *Photobacterium phosphoreum* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(3): 453-459 (in Chinese)
- [12] Guo Z, Chen G Q, Zeng G M, et al. Determination of inequable fate and toxicity of Ag nanoparticles in a *Phanerochaete chrysosporium* biofilm system through different sulfide sources [J]. Environmental Science: Nano, 2016, 3(5): 1027-1035
- [13] Chen A W, Zeng G M, Chen G Q, et al. Plasma membrane behavior, oxidative damage, and defense mechanism in *Phanerochaete chrysosporium* under cadmium stress [J]. Process Biochemistry, 2014, 49(4): 589-598
- [14] Cornelis G, Kirby J K, Beak D, et al. A method for determination of retention of silver and cerium oxide manufactured nanoparticles in soils [J]. Environmental Chemistry, 2010, 7(3): 298
- [15] Huang Z Z, Chen G Q, Zeng G M, et al. Polyvinyl alcohol-immobilized *Phanerochaete chrysosporium* and its application in the bioremediation of composite-polluted wastewater [J]. Journal of Hazardous Materials, 2015, 289: 174-183
- [16] 谭琼. 废水处理中复合纳米生物材料白腐真菌的生理响应机制研究[D]. 长沙: 湖南大学, 2015: 9-10
Tan Q. Physiological response mechanism of composite nano-biomaterial *Phanerochaete chrysosporium* in the wastewater [D]. Changsha: Hunan University, 2015: 9-10 (in Chinese)
- [17] Deraman A M, Talib I A, Omar M R, et al. Microcrystallite dimension and total active surface area of carbon electrode from mixtures of pre-carbonized oil palm empty fruit bunches and green petroleum cokes [J]. Sains Malaysiana, 2010, 39(1): 83-86
- [18] Chen G Q, Zou Z J, Zeng G M, et al. Coarsening of extracellularly biosynthesized cadmium crystal particles induced by thioacetamide in solution [J]. Chemosphere, 2011, 83(9): 1201-1207
- [19] Lad U, Kale G M, Bryaskova R. Glucose oxidase encapsulated polyvinyl alcohol-silica hybrid films for an electrochemical glucose sensing electrode [J]. Analytical Chemistry, 2013, 85(13): 6349-6355
- [20] Zuo Y N, Chen G Q, Zeng G M, et al. Transport, fate, and stimulating impact of silver nanoparticles on the re-

- removal of Cd(II) by *Phanerochaete chrysosporium* in aqueous solutions [J]. Journal of Hazardous Materials, 2015, 285: 236-244
- [21] Sanghi R, Verma P. A facile green extracellular biosynthesis of CdS nanoparticles by immobilized fungus [J]. Chemical Engineering Journal, 2009, 155(3): 886-891
- [22] Verma D K, Hasan S H, Ranjan D, et al. Modified biomass of *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on *Luffa* sponge for biosorption of hexavalent chromium [J]. International Journal of Environmental Science and Technology, 2014, 11(7): 1927-1938
- [23] Calabrese E J. Overcompensation stimulation: A mechanism for hormetic effects [J]. Critical Reviews in Toxicology, 2001, 31(4-5): 425-470
- [24] Wang Z, Xia T, Liu S J. Mechanisms of nanosilver-induced toxicological effects: More attention should be paid to its sublethal effects [J]. Nanoscale, 2015, 7(17): 7470-7481
- [25] Nel A E, Mädler L, Velegol D, et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface [J]. Nature Materials, 2009, 8(7): 543-557
- [26] Xie X L, Sun T C, Xue J Z, et al. Targeted antibacterial therapy: Ag nanoparticles cluster with pH-triggered reassembly in targeting antimicrobial applications (Adv. Funct. Mater. 17/2020) [J]. Advanced Functional Materials, 2020, 30(17): 2070106
- [27] Bae S, Hwang Y S, Lee Y J, et al. Effects of water chemistry on aggregation and soil adsorption of silver nanoparticles [J]. Environmental Health and Toxicology, 2013, 28: e2013006
- [28] Huang Z Z, Chen G Q, Zeng G M, et al. Toxicity mechanisms and synergies of silver nanoparticles in 2,4-dichlorophenol degradation by *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Journal of Hazardous Materials, 2017, 321: 37-46
- [29] Akaighe N, Maccuspie R I, Navarro D A, et al. Humic acid-induced silver nanoparticle formation under environmentally relevant conditions [J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45(9): 3895-3901 ◆