

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第38卷 第3期

Vol.38 No.3

2017

中国科学院生态环境研究中心 主办
科学出版社 出版



目次

我国人为源挥发性有机物反应性排放清单	梁小明, 张嘉妮, 陈小方, 石田立, 孙西勃, 范丽雅, 叶代启 (845)
上海城郊地区冬季霾污染事件反应性 VOCs 物种特征	高爽, 张坤, 高松, 修光利, 程娜, 潘研 (855)
京津冀地区主要排放源减排对 PM _{2.5} 污染改善贡献评估	吴文景, 常兴, 邢佳, 王书肖, 郝吉明 (867)
北京冬季 PM _{2.5} 中金属元素浓度特征和来源分析	乔宝文, 刘子锐, 胡波, 刘景云, 逢妮妮, 吴方堃, 徐仲均, 王跃思 (876)
2015 年石家庄市采暖期一次重污染过程细颗粒物在线来源解析	路娜, 李治国, 周静博, 赵鑫, 杨丽丽, 冯媛, 靳伟 (884)
利用 SPAMS 研究南宁市四季细颗粒物的化学成分及污染来源	刘慧琳, 陈志明, 毛敬英, 梁桂云, 黄炯丽, 李宏姣, 杨俊超, 莫招育 (894)
南半球海洋大气气溶胶单颗粒的理化特性分析	迟建伟, 李传金, 孙俊英, 张剑, 王辉, 王瀚韬, 李卫军 (903)
喷泉产生的细菌气溶胶空间分布特性	张崇森, 袁琳, 许鹏程, 刘可欣 (911)
生物滴滤塔净化含硫混合废气	叶杰旭, 缪孝平, 诸葛蕾, 赵翔宇, 江宁馨, 章晶晓, 陈东之, 陈建孟 (918)
西安城市不同功能区街道灰尘磁学特征及环境污染分析	房妮, 张俊辉, 王瑾, 姜珊, 夏敦胜 (924)
城乡交错带典型溪流沟渠沉积物氮污染特征及硝化-反硝化潜力	秦如彬, 李如忠, 高苏蒂, 张瑞钢 (936)
三峡库区小江支流沉积物硝化反硝化速率在蓄水期和泄水期的特征	王静, 刘洪杰, 雷禹, 徐晶, 宋立岩, 李勇 (946)
隔河岩水库二氧化碳通量时空变化及影响因素	赵登忠, 谭德宝, 李翀, 申邵洪 (954)
白洋淀多环芳烃与有机氯农药季节性污染特征及来源分析	王乙震, 张俊, 周绪申, 孔凡青, 徐铭霞 (964)
唐山陡河水库沉积物汞的分布、来源及污染评价	吴婷婷, 王明猛, 陈旭锋, 刘文利, 李太山, 闫海鱼, 何天容, 李仲根 (979)
三峡库区消落带优势草本植物淹水后汞的释放特征	邓晗, 张翔, 张成, 王永敏, 王定勇 (987)
电镀厂周边地表水中重金属分布特征及健康风险评估	余葱葱, 赵委托, 高小峰, 程胜高, 黄庭, 尹伊梦, 赵珍丽 (993)
九龙江表层沉积物重金属赋存形态及生态风险	林承奇, 胡恭任, 于瑞莲, 韩璐 (1002)
厦门筲箕湖表层沉积物金属元素赋存形态及污染评价	杨秋丽, 于瑞莲, 胡恭任, 林承奇, 韩璐 (1010)
龙口市污水灌溉区农田重金属来源、空间分布及污染评价	李春芳, 王菲, 曹文涛, 潘健, 吕建树, 吴泉源 (1018)
碳化稻壳-铁锰氧化菌耦合净化严寒村高铁锰地下水效能与机制	孙楠, 湛燕丽, 张颖, 鲁岩, 宋秋霞, 李春艳, 姜昭 (1028)
高藻水臭氧预氧化过程有机物转化及消毒副产物生成势	张赛, 胡学斌, 古励, 李莉, 郭显强 (1038)
预处理对短流程超滤工艺不可逆膜污染影响的中试试验	杨海燕, 邢加建, 王灿, 孙国胜, 赵焱, 梁恒, 徐叶琴, 李圭白 (1046)
Cu-Al ₂ O ₃ 中骨架铜类芬顿催化去除水中有机污染物	徐丹, 张丽丽, 柳丽芬 (1054)
过硫酸钾氧化去除 Cu(CN) ₂ 中的氰污染物	王云飞, 李一兵, 王彦斌, 齐璠静, 赵凯, 田世超, 郭涛, 关伟, 赵旭 (1061)
微生物燃料电池强化去除农药 2,4-二氯苯氧乙酸及同步产电性能	全向春, 全燕苹, 肖竹天 (1067)
桉树遗态结构 HAP/C 复合材料对水中 Cu(II) 的吸附特征	李超, 朱宗强, 曹爽, 朱义年, 谭笑, 丁慧 (1074)
基于 A ² /O 处理工艺的生活污水的成组生物毒性评价	张秋亚, 马晓妍, 王晓昌, 游猛 (1084)
污水氮浓度对粉绿狐尾藻去氮能力的影响	马永飞, 杨小珍, 赵小虎, 胡承孝, 谭碧玲, 孙学成, 吴金水 (1093)
全海水盐度抑制下厌氧氨氧化工艺的恢复特性	齐泮晴, 于德爽, 李津, 管勇杰, 魏思佳 (1102)
饥饿对硫自养反硝化反应器生物群落结构的影响	李芳芳, 施春红, 李海波, 袁蓉芳, 马方曙 (1109)
快速启动厌氧氨氧化工艺	闫刚, 徐乐中, 沈耀良, 吴鹏, 张婷, 程朝阳 (1116)
一种 CANON 工艺处理低氨氮废水的新模式	完颜德卿, 袁怡, 李祥, 毕贞 (1122)
侧流磷回收对低溶解氧 EBPR 系统性能的影响	马娟, 宋璐, 俞小军, 孙雷军, 孙洪伟 (1130)
厌氧氨氧化污泥群体感应信号分子检测及影响研究	陈舒涵, 李安婕, 王越兴, 吴玲娟 (1137)
有机负荷对醋糟厌氧消化系统启动的影响	戴晓虎, 于春晓, 李宁, 董滨, 戴翎翎 (1144)
过氧化钙预处理对活性污泥脱水性能的影响机制	白润英, 陈湛, 张伟军, 王东升 (1151)
不同工况蚯蚓人工湿地表层污泥处理效果	董梦珂, 李怀正, 徐一啸 (1159)
全氟辛酸对大肠杆菌的氧化胁迫和膜损伤	杨蒙, 李伟, 叶锦韶, 龙焰, 秦华明 (1167)
纳米银在环境水样和实验介质中的理化性质和毒性效应	衣俊, 程金平 (1173)
血吸虫病疫区鱼体器官中氯苯化合物的污染特征	李昆, 赵高峰, 周怀东, 张盼伟, 刘巧娜, 赵晓辉, 李东佼, 任敏, 赵丹丹 (1182)
纳米沸石对大白菜生长、抗氧化酶活性及镉形态、含量的影响	秦余丽, 熊仕娟, 徐卫红, 赵婉伊, 王卫中, 陈永勤, 迟苏琳, 陈序根, 张进忠, 熊治庭, 王正银, 谢德体 (1189)
利用 <i>in vitro</i> 方法研究不同铁矿对土壤砷生物给性的影响	钟松雄, 尹光彩, 黄润林, 何宏飞, 陈志良, 林亲铁, 王文科 (1201)
不锈钢电极对重金属污染土壤的强化电动修复及电极腐蚀结晶现象与机制	温东东, 付融冰, 张卫, 顾莹莹 (1209)
施用无害化污泥影响土壤碳库组分和碳库管理指数的演变	刘晓, 黄林, 郭康莉, 张雪凌, 杨俊诚, 姜慧敏, 张建峰 (1218)
施氮和水分管理对光合碳在土壤-水稻系统间分配的量化研究	王婷婷, 祝贞科, 朱捍华, 汤珍珠, 庞静, 李宝珍, 苏以荣, 葛体达, 吴金水 (1227)
模拟酸雨对次生林土壤呼吸及异养呼吸的影响	陈书涛, 孙鹭, 桑琳, 胡正华 (1235)
土壤硝化和反硝化微生物群落及活性对大气 CO ₂ 浓度和温度升高的响应	刘远, 王光利, 李恋卿, 潘根兴 (1245)
岩性对喀斯特灌丛土壤固氮菌与丛枝菌根真菌群落结构及丰度的影响	梁月明, 苏以荣, 何寻阳, 陈香碧 (1253)
板栗产区有机堆肥产物磷形态特征及其对叶片磷含量的影响	宋影, 郭素娟, 张丽, 孙慧娟, 谢明明, 武燕奇, 王静 (1262)
酸性物质对猪粪秸秆堆肥过程中氮素转化的影响	姜继超, 尧倩 (1272)
《环境科学》征稿简则 (1092)	
《环境科学》征订启事 (1158)	
信息 (1166, 1261, 1271)	

纳米银在环境水样和实验介质中的理化性质和毒性效应

衣俊^{1,2}, 程金平^{1,2,3*}

(1. 华东师范大学河口海岸学国家重点实验室, 上海 200062; 2. 香港城市大学深圳研究院, 深圳海洋生物多样性可持续利用重点实验室, 深圳 518057; 3. 香港科技大学环境学科, 香港)

摘要: 纳米银在自然环境中的理化性质可能严重影响其环境效应, 本文的目的是为了比较纳米银在自然水样和实验介质条件下的理化性质和毒性效应. 实验表征了粒径 4 nm 表面包裹物为油胺的纳米银, 在不同介质条件下的粒径和团聚性, 并进一步研究了不同环境介质条件下纳米银暴露对枯草芽孢杆菌的毒性效应. 透射电镜照片显示油胺包裹的 4 nm 纳米银在环境介质中发生明显团聚. 油胺包裹的 4 nm 纳米银暴露会抑制培养基中细菌的生长速率, 降低生理盐水溶液中细菌的存活率. 纳米银在实验条件下对细菌的毒性呈一定剂量效应关系, 但是在环境水样中剂量效应关系不明显. 低浓度纳米银在环境水样中的毒性比其在实验介质中弱. 纳米银的透析袋暴露实验中, 细菌的存活率有显著提升, 揭示纳米银与细菌的直接相互作用对毒性效应有重要作用. 与实验条件的培养基和生理盐水介质相比, 环境水样中的纳米银更趋向以团聚形式存在, 与细菌的相互作用几率减小, 因此纳米银在环境介质中对细菌的毒性会降低.

关键词: 纳米银; 枯草芽孢杆菌; 水生毒性; 自然水样; 实验介质条件

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2017)03-1173-09 DOI: 10.13227/j.hjxx.201608182

Physicochemical Properties and Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles: A Comparison of Environmental and Laboratorial Conditions

YI Jun^{1,2}, CHENG Jin-ping^{1,2,3*}

(1. State Key Laboratory of Estuarine and Coastal Research, East China Normal University, Shanghai 200062, China; 2. Shenzhen Key Laboratory for the Sustainable Use of Marine Biodiversity, Research Centre for the Oceans and Human Health, City University of Hong Kong Shenzhen Research Institute, Shenzhen 518057, China; 3. Environmental Science Programs, The Hong Kong University of Science and Technology, Hong Kong, China)

Abstract: This study aimed to understand how the physicochemical properties of silver nanoparticles (AgNPs) affected its toxicity in the aquatic environment. The morphologies of oleylamine-coated AgNPs (4 nm) under environmental and laboratory water conditions were studied under transmission electron microscopy, and the results showed oleylamine-coated AgNPs formed big aggregates in the environmental water samples after 12 h equilibration. Dynamic light scattering results also showed that oleylamine-coated AgNPs had larger hydrodynamic size in all water samples as compared to its primary size (4 nm). Exposure to oleylamine-coated AgNPs inhibited the growth of *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) and reduced its cell viability in Luria-Bertani (LB) broth and 0.85% NaCl, respectively. A dose-dependent toxicity of AgNPs in *B. subtilis* was observed in laboratorial medium conditions but not in environmental water condition. Low concentration of AgNPs exhibited lower toxicity in environmental water samples as compared to that in laboratorial medium conditions. Separating AgNPs from bacterial suspension through a dialysis membrane enhanced the cell viability of *B. subtilis* significantly. In the environmental water samples, the AgNPs-bacteria interaction would be reduced with the formation of big aggregates by AgNPs, which consequently decreased its toxicity in aquatic environment.

Key words: silver nanoparticles; *Bacillus subtilis*; aquatic toxicity; environmental water samples; laboratorial medium conditions

纳米银(AgNPs)由于其良好的抗菌特性被广泛应用于各个领域,是使用量最高的纳米材料,目前全世界含有纳米银的商品种类超过 400 种^[1]. 随着含有纳米银的商品大量使用,进入环境中的纳米银浓度会持续积累,给生态系统带来一定的潜在风险^[2]. 针对含纳米银的儿童产品的检测结果显示其银的释放量最高可以达到 38%^[3]. 也有研究检测到食物容器会释放纳米银颗粒,检测到的纳米银粒径范围为 10 ~ 60 nm,浓度范围是 1.66 ~ 31.46 ng·cm⁻²^[4]. 针对环境中释放的纳米材料的模型结

果表明,污水处理厂排放的污水和污泥是环境中纳米银的主要来源^[5]. 纳米银经历一系列的迁移转化会汇入河口流入海洋,给河口和海洋生态系统带来一定潜在影响^[6].

收稿日期: 2016-08-26; 修订日期: 2016-10-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(41101489); 广东省自然科学基金项目(s2012010010847); 教育部新世纪优秀人才计划项目(NECT-12-0181); 深圳科技计划重点实验室项目(ZDSYS20140509155229806)

作者简介: 衣俊(1990~),男,博士研究生,主要研究方向为生态毒理学, E-mail: 52152601009@ecnu.cn

* 通信作者, E-mail: jinpingcheng@gmail.com

微生物是生态系统的重要组成部分,广泛分布于各类环境中。微生物细胞结构简单,对污染物相对敏感,纳米银又有很强的杀菌性能,释放到环境中的纳米银会对微生物带来一定的潜在危害。近年来针对纳米银对微生物的毒理研究成为热点^[7-10]。已报道的研究多以实验室条件模拟为主要方法,并且选用细菌培养基作为暴露介质,细菌在培养基中生长良好,因此对污染物的耐受力也相对较高。自然环境中供微生物生长的营养物质是有限的,微生物在环境中的分布处于动态平衡,所以实验条件下得到的结论不能完全反映真实的环境条件。有研究比较纳米银在模拟生态系统中和实验室条件下对小型鱼类和线虫的毒性效应,结果表明从两种环境中得到的结论并不相符^[11]。有研究比较纳米氧化锌对不同培养条件中大肠杆菌的毒性差异,结果表明营养丰富的培养基提升了大肠杆菌对纳米银的耐受力^[12]。环境因子如 pH 值、溶解有机质和离子配体会影响纳米银的团聚、释放等理化性质,并影响其毒性效应^[13-15]。

纳米银的理化性质决定其毒性效应^[16]。目前已报道的研究多以纳米银的静态暴露为实验方法,或者直接将纳米银加入暴露体系,忽略了纳米银在介质中的动态平衡。纳米银的粒径分布、溶解性和团聚等性质在实验控制条件和真实环境中的对比研究十分有限。本实验比较油胺包裹的 4 nm 纳米银在环境水样和实验介质条件下理化性质,进一步比较在不同培养条件下纳米银对枯草芽孢杆菌毒性效应,并探讨纳米银的毒性机制。本文对研究自然环境尤其是条件复杂的河口环境中纳米材料的毒性效应提供一定的科学参考。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

试剂:纳米银粉购自于苏州冷石纳米材料科技有限公司,平均粒径是 (4 ± 1) nm,纯度为 99.5%,表面包裹物是油胺;细菌存活率检测试剂盒(LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits, L7012, Molecular Probes, Inc. Eugene, Oregon, USA)购自于上海麦野生物科技有限公司;硝基腐殖酸购自于梯希爱(上海)化成工业发展有限公司;人工海水配方($400 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠, $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钾, $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二水合氯化钙, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 六水合氯化镁, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 七水合硫酸镁, $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸氢钠,盐度为 28 ‰)^[17];纯水选择电阻率为

$18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 的 Milli-Q 纯水(电导率 $< 0.1 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$)。枯草芽孢杆菌(ATCC 6633)购自于广东省微生物研究所微生物菌种保藏中心;细菌培养基(Luria-Bertani Medium, LB 培养基,组成成分为 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白胨, $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 牛肉膏, $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠)和磷酸盐缓冲溶液(PBS 溶液)均购自于生工生物工程(上海)股份有限公司。

仪器:超声波清洗仪(SB-520DTDN,宁波新芝公司);恒温摇床(SPH-103B,上海世平实验设备有限公司);SpectraMax 多功能酶标仪(美国, Molecular Device 公司);透射电子显微镜(Transmission Electron Microscope, TEM, JEM-2100, 日本, HITACHI 公司);Malvern Zetasizer Nano ZS 动态光散射粒度仪(英国, Malvern Instruments 公司);电感耦合等离子体质谱仪(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS, Neptune, 德国, Thermo 公司)。

1.2 环境水样采集

水环境样品于 2015 年 5 月于大通水文观测站南部($117^{\circ}37.835'\text{E}$, $30^{\circ}46.150'\text{N}$)、中部($117^{\circ}37.705'\text{E}$, $30^{\circ}46.441'\text{N}$)和北部($117^{\circ}37.533'\text{E}$, $30^{\circ}46.863'\text{N}$)这 3 个采样点采集,3 个站点采集的样品均为表层水样,将 3 个采样点的水样等量混合以代表大通水文站样品,样品存储于聚丙烯材质的桶中,存储温度不超过 24°C 。样品的基本理化参数为:平均盐度值为 $(0.20 \pm 0.05)\text{‰}$;平均 pH 值(8.01 ± 0.01);平均电导率值为 $(0.15 \pm 0.05) \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$;溶解有机碳含量为 $103.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。大通水文站位于长江上游,受潮汐影响较不明显,一定程度上代表了长江下游的河口水环境情况。水样经 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤后室温保存备用,时间不超过 7 d。

1.3 纳米银的表征

将 0.1 g 纳米银粉分散至 100 mL Milli-Q 纯水中,超声分散(220 V , $40 \times 10^3 \text{ Hz}$)1 h,制备成纳米银储备液,避光储存至 4°C 。将纳米银储备液分别分散至 Milli-Q 纯水、人工海水、含 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 硝基腐殖酸的纯水和河口水样中,制备成纳米银悬浮液,放置于恒温摇床($160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 30°C)平衡 12 h。平衡后将纳米银悬浮液超声分散 30 min,取一滴悬浮液滴在铜网上,待室温下完全干燥后,用于透射电子显微镜观察。取上述不同介质中的纳米银悬浮液 1.5 mL ,用动态光散射粒度仪测量纳米银的水动力粒径。

为了研究纳米银释放银离子的含量,控制释放环境与暴露环境一致,用 Amicon Ultra-0.5 3K 超滤

管(孔径 1 ~ 2 nm)将纳米银悬浮液分离(14 000 $r \cdot \min^{-1}$, 40 min),分离出的银离子(粒径约 0.3 nm)溶液用浓硝酸酸化后用 ICP-MS 测定其含量,实验结果显示纳米银释放银离子的含量极低,并且用相同剂量的硝酸银暴露细菌,并未发现对细菌产生毒性效应。

1.4 纳米银毒性实验设计

(1) 枯草芽孢杆菌的培养 将枯草芽孢杆菌接种于 LB 固体培养基中,并储存至 4℃。每次暴露实验前,将菌种重新接种于新鲜的 LB 液体培养基中,放入恒温摇床(200 $r \cdot \min^{-1}$, 30℃)培养 12 h 至对数期,作为备用细菌悬浮液。

(2) 细菌生长速率测定 取对数期的细菌悬浮液离心(4 500 $r \cdot \min^{-1}$, 5 min),用 PBS 溶液清洗 3 遍后悬浮至新鲜的 LB 培养基中,用酶标仪测量细菌在 600 nm 可见光波长下的光密度(D_{600}),并用 LB 培养基调节至 $D_{600} = 0.05$ 。将不同介质中的纳米银悬浮液梯度稀释后,取 20 μL 与 180 μL 细菌悬浮液混合加入至 96 孔细胞培养板中,使得纳米银暴露浓度为 0、90、900、1 800 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,每组设置 3 个平行。将 96 孔培养板放置恒温摇床(200 $r \cdot \min^{-1}$, 30℃)培养,12h 后测定细菌悬浮液的 D_{600} 。测量结束后,细菌的生长抑制率(%)计算公式为:

$$\text{生长抑制率}(\%) = [1 - (N/N_0)] \times 100\%$$

式中, N_0 和 N 分别代表空白组和暴露组细菌悬浮液的 D_{600} 。

(3) 细菌存活率测定 取对数期的细菌悬浮液离心,用 PBS 溶液清洗 3 遍后悬浮至 0.85% NaCl 溶液中,并用 0.85% NaCl 调节细菌悬浮液 $D_{600} = 0.2$ 。然后将不同介质中的纳米银溶液梯度稀释与同体积的细菌悬浮液混合加入 24 孔细胞培养板,使得纳米银暴露浓度为 0、90、900、1800 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,每组设置 3 个平行。将 24 孔培养板放置恒温摇床培养,3 h 后收集细菌悬浮液,取 100 μL 细菌悬浮液和 100 μL 细菌存活率检测试剂至 96 孔荧光酶标板中,参照细菌存活率检测试剂盒的实验方法进行测定。检测混合液在波长 485 nm 处激发光下,分别在波长 530 nm 和 630 nm 处吸收光强度。其中,530 nm 处荧光强度(F_{530})反映活细菌细胞密度,630 nm 处荧光强度(F_{630})反映死细菌细胞密度,荧光强度比值(F_{530}/F_{630})反映活细菌的含量(%)。细菌的存活率(%)计算公式为:

$$\text{细菌的存活率}(\%) = (R/R_0) \times 100\%$$

式中, R_0 和 R 分别代表空白组和暴露组的荧光强度

比值。

(4) 环境因子对毒性实验的影响 设置纳米银在河口水样中的平衡时间分别为 12 h 和 7 d^[18],研究纳米银在河口水样中的平衡时间对其毒性效应的影响。在保证暴露条件相同的前提下,利用上述实验方法,分别测定在河口水样中平衡 12 h 和 7 d 后,纳米银暴露后的枯草芽孢杆菌生长速率和存活率。

配制人工海水使其 pH 值分别为 7.6、8.1、8.6 (近似自然海水的 pH 值范围),将纳米银分散至 3 种海水中平衡 12 h 后,研究 pH 值对纳米银毒性效应的影响。在保证暴露条件相同的前提下,利用上述实验方法,分别测定不同 pH 值条件下,纳米银暴露后枯草芽孢杆菌的存活率。

将硝基腐殖酸分别加入不同介质(Milli-Q 纯水、人工海水和河口水样)平衡 12 h,使硝基腐殖酸在暴露体系中的浓度为 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[19],研究腐殖酸对纳米银毒性的影响。在保证暴露条件相同的前提下,利用上述实验方法,分别测定加入腐殖酸前后,纳米银暴露后的枯草芽孢杆菌的存活率。

(5) 纳米银分离实验 为了研究纳米银产生毒性的主要原因,用 3.5×10^3 透析袋(Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA, USA)将纳米银密封,使纳米银与细菌分离。透析袋孔径为 1 ~ 2 nm,纳米银不能透过透析袋进入细菌悬浮液。收集对数期的细菌悬浮液,用 PBS 溶液清洗 3 遍后悬浮至 0.85% NaCl 溶液中,并用 0.85% NaCl 调节细菌悬浮液 $D_{600} = 0.2$ 。将纳米银直接加入含有 20 mL 细菌悬浮液的离心管中,每组设置 3 个平行,作为空白组。离心管体积为 50 mL,纳米银与细菌相互混合。在保证相同暴露条件下,取 20 mL 细菌悬浮液和包裹纳米银的透析袋于离心管中,保证透析袋完全密封并浸没于细菌悬浮液,每组设置 3 个平行,作为对照组。暴露体系中纳米银的浓度均为 1 800 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。将 50 mL 离心管放置恒温摇床培养 3h,然后测定枯草芽孢杆菌的存活率。

1.5 统计方法

纳米银单分散态粒径用 ImageJ2x 软件(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)测量 TEM 图片中单分散的纳米银颗粒在同一个方向上的直径,统计并制作直方图。暴露实验的实验结果用平均值 $\pm$ 均值标准误差(Mean $\pm$ SEM)表示, $n = 3$ 。数据用 GraphPad Prism 5 软件分析并检验显著性, $P < 0.05$ 代表数据之间有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 纳米银在不同条件下的粒径分布和团聚情况

图1分别展示实验介质(Milli-Q纯水、人工海水和硝基腐殖酸溶液)和自然水样(河口水样)中油胺包裹的4 nm纳米银的透射电镜照片。照片显示油胺包裹的4 nm纳米银在实验介质的介质中基本形态呈球形,在纯水中纳米银分布均匀,虽然分布范围密集,但是并没有明显的团聚现象[图1(a)]。纳米银在海水中的团聚现象较为明显[图1(b)]。在含有硝基腐殖酸的介质中,部分纳米银有团聚的现象,也有部分纳米银颗粒的分布相对分散[图1(c)]。图1(d)展示了纳米银在河口水样中的透射电镜照片,照片显示纳米银在河口水样中有明

显的团聚现象,纳米银被一层膜物质包裹因此导致团聚。

图2表明油胺包裹的4 nm纳米银在介质中的单分散态粒径分布,经统计纳米银的单分散态粒径符合正态分布,介于2.36~8.96 nm之间,平均粒径为 (4.75 ± 1.25) nm[图2(a)],结果与纳米银出厂报告数据(4 nm)相近。图2(b)结果表明纳米银在纯水中的水动力粒径拟合曲线显示两个峰值,分别是3.1 nm(强度6.9%)和111.3 nm(强度69.1%),在海水中水动力粒径拟合曲线显示1个峰值为232.7 nm(强度100%)。而纳米银在河口水样中水动力粒径拟合曲线显示3个峰值[图2(c)],分别为1.571 nm(强度16.3%)、87.3 nm(强度39.7%)和363.9 nm(强度44%)。

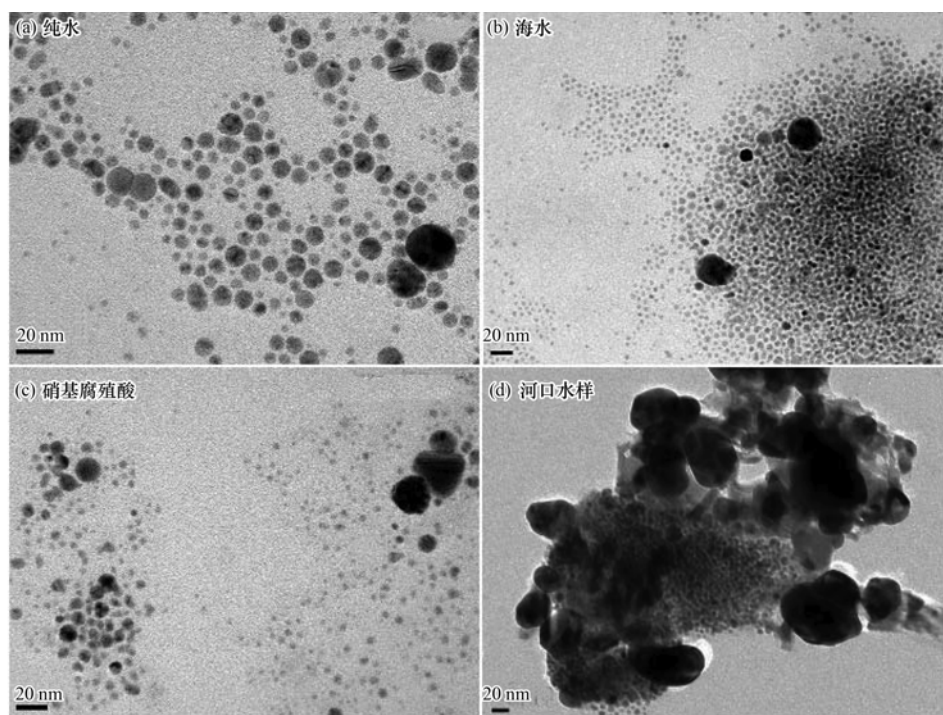


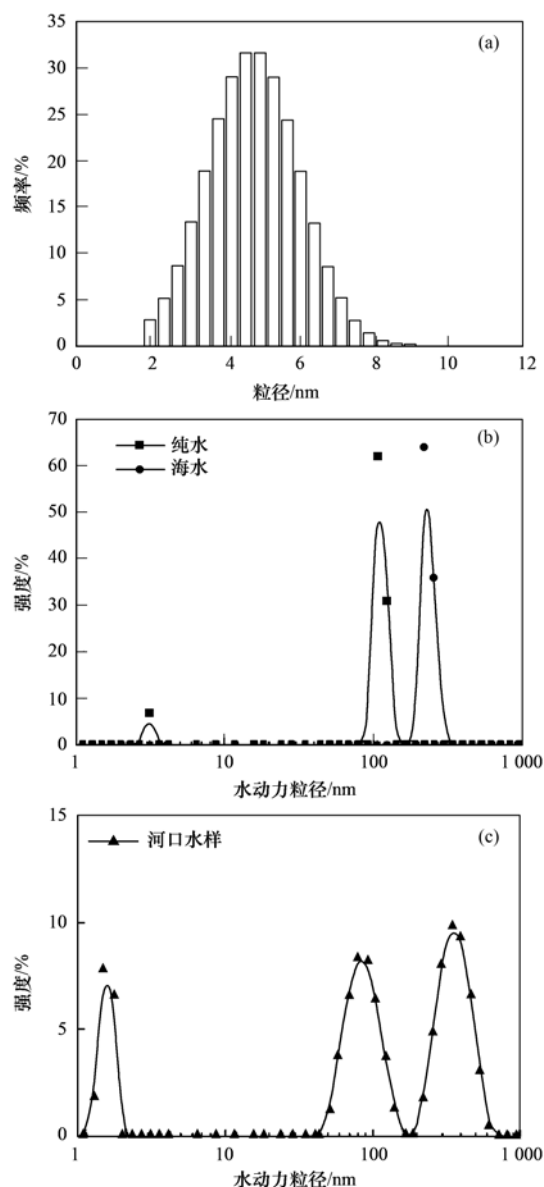
图1 纳米银在纯水、海水、硝基腐殖酸溶液和河口水样中平衡12 h后的透射电镜照片

Fig. 1 TEM images of AgNPs in Milli-Q water, seawater, NHA and estuarine water after 12 h equilibration

2.2 纳米银暴露抑制枯草芽孢杆菌的生长

图3(a)表明不同环境中油胺包裹的4 nm纳米银对枯草芽孢杆菌在实验介质(LB液体培养基)下12 h生长的抑制作用。在纯水和海水中,随着纳米银浓度的升高,其对细菌生长的抑制率随之升高。当纳米银浓度较低($9 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $90 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)时,对细菌生长的抑制作用并不明显,抑制率不超过10%。当纳米银浓度上升到 $900 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,纯水和海水中纳米银对细菌生长的抑制率分别约为20%和35%。当纳米银浓度为最高值 $1800 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,纯水

和海水中纳米银对细菌生长的抑制率分别约为71%和97%。但是在环境介质中(河口水样),纳米银对枯草芽孢杆菌生长抑制作用未表现出一定的剂量效应关系。当纳米银浓度较低($9 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $90 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)时,河口水样中纳米银对细菌生长的抑制率约为8%,当纳米银浓度为最高值 $1800 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,其对细菌生长的抑制率仅约为12%。当纳米银浓度为 $9 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,河口水样中的纳米银对细菌的生长抑制作用强于其在纯水中($P < 0.05$)。当纳米银的浓度 $\geq 900 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,不同介质中纳米银抑制



(a) TEM 照片统计的纳米银原始粒径; (b) 和 (c) 纳米银在纯水、海水和河口水样中的水动力粒径

图 2 纳米银的原始粒径和水动力粒径结果

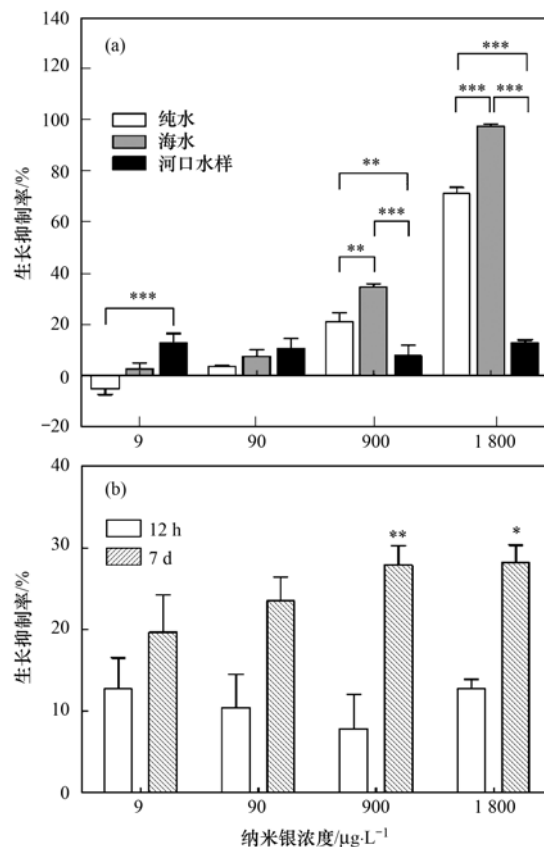
Fig. 2 Primary size and hydrodynamic diameter of AgNPs

细菌生长能力总体呈现为海水 > 纯水 > 河口水样 ($P < 0.05$).

图 3(b) 进一步研究平衡时间对河口水样中纳米银抑制枯草芽孢杆菌生长效应的影响, 结果表明, 当纳米银浓度 $\geq 900 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 在河口水样中平衡 7 d 的纳米银, 对细菌生长抑制作用比平衡 12 h 的纳米银有显著性增强 ($P < 0.05$).

2.3 纳米银暴露减弱枯草芽孢杆菌的存活率

图 4(a) 表明经过不同介质中油胺包裹的 4 nm 纳米银暴露 3 h 后, 枯草芽孢杆菌在近似环境条件下 (0.85% NaCl 溶液) 的存活率. 当纳米银浓度 $\leq$

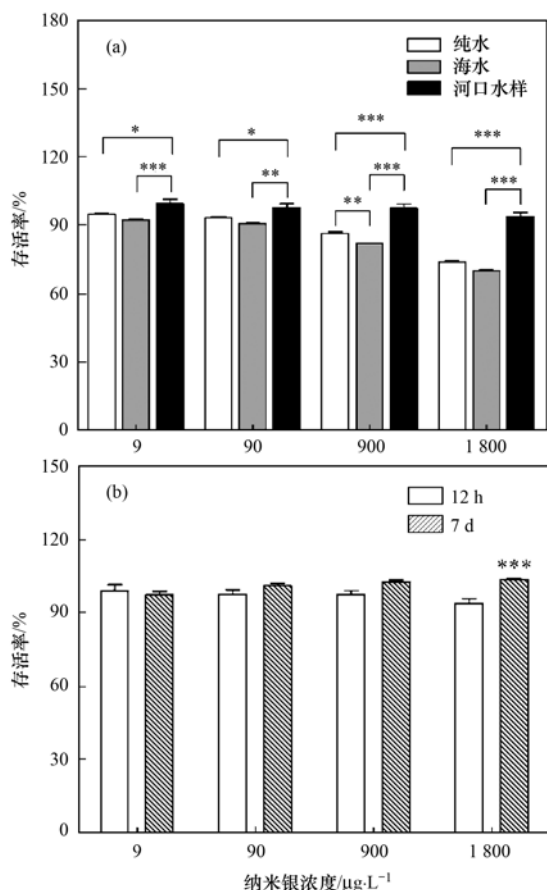


(a) 不同水环境中纳米银暴露 12 h 后的枯草芽孢杆菌的生长情况; (b) 不同平衡时间对河口水样中纳米银暴露 12 h 后的枯草芽孢杆菌生长的影响; 结果与空白实验组作百分比, 星号代表数据之间的显著性差异 (* 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$, *** 表示 $P < 0.001$)

图 3 纳米银暴露 12 h 后枯草芽孢杆菌的生长抑制率结果

Fig. 3 Growth inhibition of *B. subtilis* after exposure to AgNPs for 12 h

$90 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 细菌细胞的损伤情况并不明显, 海水的纳米银对细胞的损伤程度比纯水中的纳米银较强一点, 但存活率都超过 90%. 当纳米银浓度上升到 $900 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 纯水和海水中的纳米银对细菌细胞的损伤程度加剧, 并且当纳米银浓度达到最高 $1800 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时损伤程度随之提升至最高, 存活率分别降为 73% 和 70%. 但是在河口水样中, 纳米银对细胞损伤程度较弱, 当纳米银浓度 $\leq 90 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 存活率超过 97%. 当纳米银浓度达到最高 $1800 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 后, 河口水样中纳米银对细菌细胞的损伤仅有 7% (存活率 93%). 当纳米银浓度为 $900 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 海水中的纳米银降低细菌存活率的能力比其在纯水中强 ($P < 0.05$). 在不同暴露浓度下 (9、90、900、1800 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 河口水样中的纳米银对细菌存活率的削弱能力均比其在纯水和海水中弱 ($P < 0.05$).



(a) 不同水环境中纳米银暴露 3 h 后的枯草芽孢杆菌的存活率;
(b) 不同平衡时间对河口水样中纳米银暴露 3 h 后的枯草芽孢杆菌存活率的影响

图 4 纳米银暴露 3 h 后枯草芽孢杆菌的存活率结果

Fig. 4 Cell viability of *B. subtilis* after exposure to AgNPs for 3 h

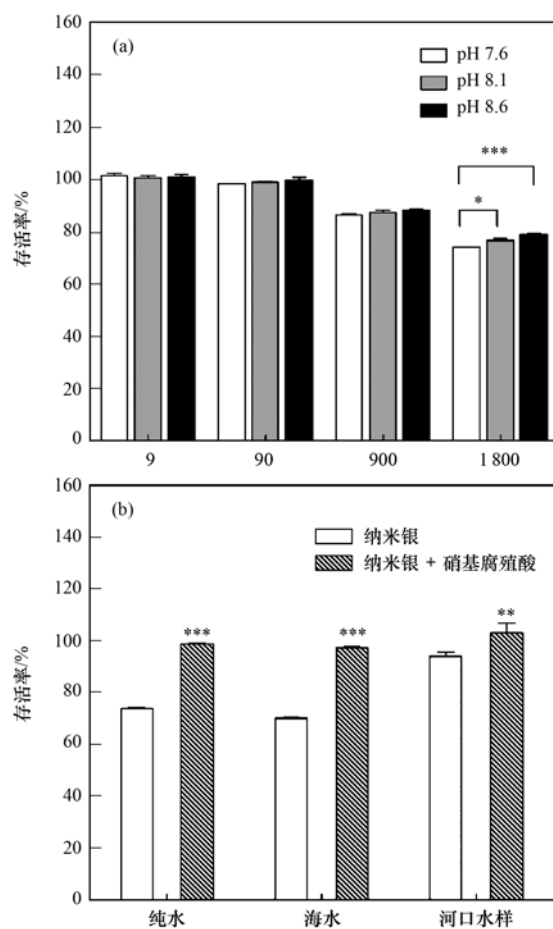
图 4(b) 进一步研究平衡时间对河口水样中纳米银降低枯草芽孢杆菌存活率效应的影响, 结果表明, 当纳米银浓度为 $1800 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 在河口水样中平衡 7 d 的纳米银, 对枯草芽孢杆菌存活率的削弱能力比平衡 12 h 的纳米银有显著性减弱 ($P < 0.05$).

2.4 环境因子对纳米银毒性效应的影响

图 5(a) 表示不同 pH 值 (7.6、8.1、8.6) 的海水中油胺包裹的 4 nm 纳米银对枯草芽孢杆菌存活率的削弱作用呈一定的剂量效应关系, 并且当纳米银浓度为 $1800 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时有显著性差异 ($P < 0.05$), 表现为 $\text{pH } 7.6 > \text{pH } 8.1 > \text{pH } 8.6$. 图 5(b) 表明了硝基腐殖酸对纳米银削弱细菌存活率作用的影响. 结果表明, 当纳米银的浓度为 $1800 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 加入 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 硝基腐殖酸后, 纳米银的毒性效应被明显减弱 ($P < 0.05$).

2.5 动态混合对纳米银的毒性效应的影响

图 6 表示, 油胺包裹的 4 nm 纳米银与细菌的混合与分离, 对暴露后的枯草芽孢杆菌存活率的影响.

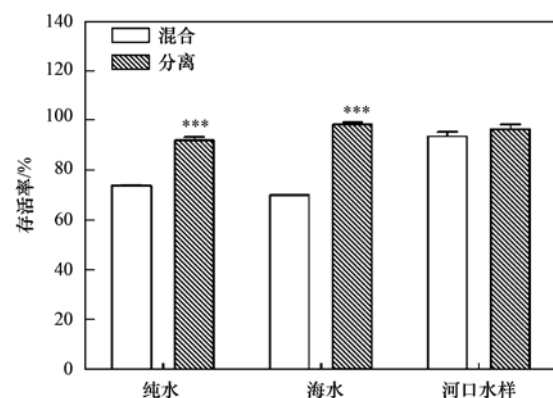


条件: (b) 纳米银浓度为 $1800 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,

硝基腐殖酸浓度为 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

图 5 pH 值和硝基腐殖酸对纳米银暴露 3 h 后的枯草芽孢杆菌存活率的影响

Fig. 5 Cell viability of *B. subtilis* after exposure to AgNPs for 3 h as a function of pH value and NHA



条件: 纳米银浓度为 $1800 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

图 6 混合和分离对纳米银暴露枯草芽孢杆菌 3 h 后存活率的影响

Fig. 6 Cell viability of *B. subtilis* after 3 h of direct and separate exposure to AgNPs

结果表明,与纳米银直接和细菌悬浮液混合相比,放入透析袋后的纳米银对枯草芽孢杆菌存活率的减弱作用被明显削弱。在纯水和海水中,纳米银的毒性效应分别被削弱约 18% 和 28% ($P < 0.05$)。

3 讨论

纳米银的尺寸一定程度上会影响其对细菌的毒性效应^[20]。Park 等^[21]证明小粒径的纳米颗粒更容易被细胞摄入并导致细胞损伤。研究环境中纳米银的理化性质和毒性效应不能仅参考纳米银的原始粒径,也要重视纳米银在环境中的水动力粒径。TEM 可以表明纳米银在介质中的真实粒径,在本实验中,TEM 照片统计的结果表明,纳米银的单颗粒粒径约为 (4.75 ± 1.25) nm,结果与纳米银出厂报告中粒径的数据(4 nm)相近。但是透射电镜在观察上有一定的局限性,并不能反映纳米银在介质中整体粒径分布情况。DLS 可以表明纳米银在介质中整体的粒径分布,但由于 DLS 数据是通过光强度信号计算得到的,对介质中进行布朗运动的大颗粒比较敏感,因此检测得到的纳米银水动力粒径,比 TEM 观察到的单分散直径大。Zhang 等^[22]表明纳米银在不同水介质中往往以团聚的形式存在,纳米银在介质中的水动力粒径要比单分散态粒径大几十甚至上百倍。纳米银的分散介质离子强度越高,颗粒之间的双电层越容易被压缩,团聚现象越明显^[23,24]。

纳米银的表面包裹物也会一定程度影响其理化性质。本实验选用的纳米银表面包裹物是油胺,通过实验发现,纳米银在本实验选用的所有水介质中,其 Zeta 电位均为负值。在实验介质(Milli-Q 纯水和人工海水)中,纳米银颗粒之间存在电荷一致性,产生的电荷排斥力,导致纳米银颗粒之间有一定的分散性。有研究表明腐殖酸的加入会使纳米银带电量增加,Zeta 电位绝对值增加,从而减弱纳米银的团聚^[17]。本实验中同样观察到纳米银在硝基腐殖酸中有一定的分散性。有研究通过建立模型,表明天然胶体会影响颗粒的传输和沉降^[25]。此外,有研究表明环境中植物所释放出的溶解有机碳能够吸附纳米银颗粒,导致其发生明显团聚^[11]。本实验中,经测量发现河口水样中溶解有机碳的浓度为 $103.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,由于溶解有机碳包含胶体有机碳,因此推断河口水样中同样存在胶体。河口水样中纳米银产生明显团聚,可能的原因是河口水样中的溶解有机碳和胶体等具有吸附性的物质,吸附纳米银颗粒,导致纳米银颗粒的团聚^[26]。目前已有研究多使用

以聚乙烯吡咯烷酮为包裹物的纳米银作为研究对象,这使得纳米银有较好的亲水性,更容易释放出银离子,导致毒性效应^[27-29]。而本实验选择的纳米银亲水性差,释放银离子的过程相对缓慢,在环境中具有较强持久性。

纳米银会抑制培养基中枯草芽孢杆菌的生长。细菌在培养基中生长良好,因此较低浓度的纳米银对细菌生长抑制作用并不明显。随着纳米银暴露浓度的增加,纳米银颗粒的数量增加,因此随着更多纳米银颗粒与细菌的动态混合,导致纯水和海水中纳米银,对细菌生长的抑制作用,呈现一定的剂量效应关系。但是纳米银在河口水样中容易发生团聚,即使纳米银暴露浓度增加,颗粒数量增加,还是有大量纳米银颗粒被吸附。所以,在河口水样中的纳米银,对细菌生长的抑制作用和对细菌存活率的减弱作用,没有呈现一定的剂量效应关系。因此,随着暴露浓度的升高,纳米银抑制细菌生长的整体趋势,表现为河口水样中纳米银对细菌生长抑制作用强于其在纯水和海水中。此外,海水中纳米银对细菌生长抑制作用比其在纯水中强,这可能是因为海水的离子强度较高,使得纳米银颗粒之间的双电层被压缩,从而增加了纳米银与细菌接触的几率,抑制细菌的生长。有研究表明随着离子强度的增加,纳米银会形成更多的分形结构,进一步增加其与细菌细胞的接触作用^[30]。

纳米银会降低生理盐水中枯草芽孢杆菌的存活率。在不同的暴露浓度下,河口水样中的纳米银降低枯草芽孢杆菌存活率的能力,均比其在纯水和海水中弱,这可能是纳米银在河口水样中产生明显团聚,抑制了纳米银与细菌的动态混合作用,从而导致纳米银降低细菌存活率的能力降低。纳米银的沉降减弱了其悬浮细菌的相互作用,但在一定程度上也会影响沉积物中的微生物群落的组成^[31]。天然河口水样中富含溶解有机碳和胶体有机碳等具有吸附性的物质,有研究证实这些物质会降低纳米银的毒性效应^[13,32]。并且生态系统中的植物释放的溶解有机碳同样会降低纳米银的毒性^[11]。本实验选用的河口水样中含有溶解有机碳,能够吸附纳米银颗粒并导致其团聚,导致其减弱细菌存活率的能力下降。纳米银在实验培养条件(LB 液体培养基)下抑制细菌的生长,但由于培养基为细菌的生长提供充足的营养物质,随着细菌的繁殖速度超过抑制速度,细菌最终会大量繁殖(超过 24 h)。但在自然环境中,营养物质相对平衡,细菌的分布和丰度相对稳

定,因此污染物的介入可能直接杀死细菌并导致微生物种群的变化.使用透析袋将纳米银密封后,纳米银被截留,但是银离子可以自由通过透析袋,透析后的纳米银毒性效应被显著削弱,表明本实验观察到的毒性效应并非由纳米银释放有毒的银离子产生,而是由纳米银与细菌的动态混合而产生^[25,33].

4 结论

(1)油胺包裹的4 nm 纳米银在环境水样中会产生明显的团聚.

(2)油胺包裹的4 nm 纳米银在培养基介质中抑制枯草芽孢杆菌的生长,在生理盐水介质中降低枯草芽孢杆菌的存活率.

(3)油胺包裹的4 nm 纳米银与细菌动态混合,通过相互作用对细菌产生毒性效应.自然环境条件尤其是河口环境条件相对复杂,含溶解有机碳等吸附作用较强的物质,这些物质通过与纳米银相互作用的竞争,抑制纳米银与细菌动态混合的作用,减弱纳米银的毒性.

参考文献:

- [1] Vance M E, Kuiken T, Vejerano E P, *et al.* Nanotechnology in the real world: redeveloping the nanomaterial consumer products inventory[J]. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 2015, **6**: 1769-1780.
- [2] Mijndonckx K, Leys N, Mahillon J, *et al.* Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance[J]. *BioMetals*, 2013, **26**(4): 609-621.
- [3] Quadros M E, Pierson IV R, Tulve N S, *et al.* Release of silver from nanotechnology-based consumer products for children[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, **47**(15): 8894-8901.
- [4] Echegoyen Y, Nerín C. Nanoparticle release from nano-silver antimicrobial food containers [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, **62**: 16-22.
- [5] Gottschalk F, Nowack B. The release of engineered nanomaterials to the environment[J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 2011, **13**(5): 1145-1155.
- [6] Matrangola V, Corsi I. Toxic effects of engineered nanoparticles in the marine environment: model organisms and molecular approaches[J]. *Marine Environmental Research*, 2012, **76**: 32-40.
- [7] Ivask A, Elbadawy A, Kaweeteerawat C, *et al.* Toxicity mechanisms in *Escherichia coli* vary for silver nanoparticles and differ from ionic silver[J]. *ACS Nano*, 2014, **8**(1): 374-386.
- [8] Pal S, Tak Y K, Song J M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, **73**(6): 1712-1720.
- [9] Zhou Y, Kong Y, Kundu S, *et al.* Antibacterial activities of gold and silver nanoparticles against *Escherichia coli*, and *Bacillus Calmette-Guérin* [J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2012, **10**: 19.
- [10] Dhas S P, Shiny P J, Khan S, *et al.* Toxic behavior of silver and zinc oxide nanoparticles on environmental microorganisms [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2014, **54**(9): 916-927.
- [11] Bone A J, Matson C W, Colman B P, *et al.* Silver nanoparticle toxicity to Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) and *Caenorhabditis elegans*: a comparison of mesocosm, microcosm and conventional laboratory studies [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2015, **34**(2): 275-282.
- [12] Li M, Zhu L Z, Lin D H. Toxicity of ZnO nanoparticles to *Escherichia coli*: mechanism and the influence of medium components[J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, **45**(5): 1977-1983.
- [13] Seitz F, Rosenfeldt R R, Storm K, *et al.* Effects of silver nanoparticle properties, media pH and dissolved organic matter on toxicity to *Daphnia magna* [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, **111**: 263-270.
- [14] Yang X Y, Jiang C J, Hsu-Kim H, *et al.* Silver nanoparticle behavior, uptake, and toxicity in *Caenorhabditis elegans*: effects of natural organic matter [J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, **48**(6): 3486-3495.
- [15] Levard C, Mitra S, Yang T, *et al.* Effect of chloride on the dissolution rate of silver nanoparticles and toxicity to *E. coli* [J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, **47**(11): 5738-5745.
- [16] Nowack B. Nanosilver revisited downstream[J]. *Science*, 2010, **330**(6007): 1054-1055.
- [17] Fabrega J, Zhang R, Renshaw J C, *et al.* Impact of silver nanoparticles on natural marine biofilm bacteria [J]. *Chemosphere*, 2011, **85**(6): 961-966.
- [18] Sørensen S N, Baun A. Controlling silver nanoparticle exposure in algal toxicity testing—a matter of timing[J]. *Nanotoxicology*, 2015, **9**(2): 201-209.
- [19] 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.
- [20] Matzke M, Jurkschat K, Backhaus T. Toxicity of differently sized and coated silver nanoparticles, to the bacterium *Pseudomonas putida*: risks for the aquatic environment? [J]. *Ecotoxicology*, 2014, **23**(5): 818-829.
- [21] Park M V D Z, Neigh A M, Vermeulen J P, *et al.* The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles[J]. *Biomaterials*, 2011, **32**(36): 9810-9817.
- [22] Zhang W, Crittenden J, Li K G, *et al.* Attachment efficiency of nanoparticle aggregation in aqueous dispersions: modeling and experimental validation [J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, **46**(13): 7054-7062.
- [23] Li Y, Niu J F, Zhang W, *et al.* Influence of aqueous media on the ROS-mediated toxicity of ZnO nanoparticles toward green fluorescent protein-expressing *Escherichia coli* under UV-365 irradiation[J]. *Langmuir*, 2014, **30**(10): 2852-2862.
- [24] Bizmark N, Ioannidis M A. Effects of ionic strength on the colloidal stability and interfacial assembly of hydrophobic ethyl

- cellulose nanoparticles [J]. *Langmuir*, 2015, **31** (34): 9282-9289.
- [25] Areepitak T, Ren J H. Model simulations of particle aggregation effect on colloid exchange between streams and streambeds [J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, **45** (13): 5614-5621.
- [26] El Badawy A M, Silva R G, Morris B, *et al.* Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles [J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, **45** (1): 283-287.
- [27] Radzig M A, Nadochenko V A, Koksharova O A, *et al.* Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013, **102**: 300-306.
- [28] 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.
- [29] Kittler S, Greulich C, Diendorf J, *et al.* Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions [J]. *Chemistry of Materials*, 2010, **22** (16): 4548-4554.
- [30] Chambers B A, Afroz A R M N, Bae S, *et al.* Effects of chloride and ionic strength on physical morphology, dissolution, and bacterial toxicity of silver nanoparticles [J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, **48** (1): 761-769.
- [31] Bradford A, Handy R D, Readman J W, *et al.* Impact of silver nanoparticle contamination on the genetic diversity of natural bacterial assemblages in estuarine sediments [J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, **43** (12): 4530-4536.
- [32] Blinova I, Niskanen J, Kajankari P, *et al.* Toxicity of two types of silver nanoparticles to aquatic crustaceans *Daphnia magna*, and *Thamnocephalus platyurus* [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2013, **20** (5): 3456-3463.
- [33] Bondarenko O, Ivask A, K  inen A, *et al.* Particle-cell contact enhances antibacterial activity of silver nanoparticles [J]. *PLoS One*, 2013, **8** (5): e64060.

CONTENTS

Reactivity-based Anthropogenic VOCs Emission Inventory in China	LIANG Xiao-ming, ZHANG Jia-ni, CHEN Xiao-fang, <i>et al.</i> (845)
Characteristics of Reactive VOCs Species During High Haze-Pollution Events in Suburban Area of Shanghai in Winter	GAO Shuang, ZHANG Kun, GAO Song, <i>et al.</i> (855)
Assessment of PM _{2.5} Pollution Mitigation due to Emission Reduction from Main Emission Sources in the Beijing-Tianjin-Hebei Region	WU Wen-jing, CHANG Xing, XING Jia, <i>et al.</i> (867)
Concentration Characteristics and Sources of Trace Metals in PM _{2.5} During Wintertime in Beijing	QIAO Bao-wen, LIU Zi-rui, HU Bo, <i>et al.</i> (876)
Online Source Analysis of Particulate Matter (PM _{2.5}) in a Heavy Pollution Process of Shijiazhuang City During Heating Period in 2015	LU Na, LI Zhi-guo, ZHOU Jing-bo, <i>et al.</i> (884)
Analysis of Chemical Composition and Pollution Source of the Fine Particulate Matter by the SPAMS in the Four Seasons in Nanning	LIU Hui-lin, CHEN Zhi-ming, MAO Jing-ying, <i>et al.</i> (894)
Physico-chemical Characteristics of Individual Aerosol Particles in Marine Atmosphere on South Hemisphere	CHI Jian-wei, LI Chuan-jin, SUN Jun-ying, <i>et al.</i> (903)
Characteristics of Spatial Distribution of Bacterial Aerosols Produced by Fountain	ZHANG Chong-miao, YUAN Lin, XU Peng-cheng, <i>et al.</i> (911)
Removal of Volatile Sulfur Odor by the Biotrickling Filter	YE Jie-xu, MIAO Xiao-ping, ZHUGE Lei, <i>et al.</i> (918)
Magnetic Characteristics and Environmental Pollution Analysis of Street Dust in Different Functional Zones of Xi'an City	FANG Ni, ZHANG Jun-hui, WANG Jin, <i>et al.</i> (924)
Pollution Characteristics and Nitrification and Denitrification Potential of Superficial Sediments from Streams in an Urban-Rural Fringe	QIN Ru-bin, LI Ru-zhong, GAO Su-di, <i>et al.</i> (936)
Nitrification and Denitrification Rates in a Small Tributary, Nanhe River, of Three Gorge Dam Reservoir During Water Collection and Release Events	WANG Jing, LIU Hong-jie, LEI Yu, <i>et al.</i> (946)
Tempo-spatial Variations and Influential Factors of Carbon Dioxide Emissions from the Geheyan Reservoir over the Qingjiang River Basin, China	ZHAO Deng-zhong, TAN De-bao, LI Chong, <i>et al.</i> (954)
Seasonal Pollution Characteristics and Source Identification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Organochlorine Pesticides in Surface Water of Baiyangdian Lake	WANG Yi-zhen, ZHANG Jun, ZHOU Xu-shen, <i>et al.</i> (964)
Distributions, Sources and Pollution Assessment of Hg in Sediment of Douhe Reservoir in Tangshan City	WU Ting-ting, WANG Ming-meng, CHEN Xu-feng, <i>et al.</i> (979)
Release Characteristics of Mercury from Submersed Typical Herbaceous Plants in the Water-Level Fluctuation Zone of the Three Gorges Reservoir Area	DENG Han, ZHANG Xiang, ZHANG Cheng, <i>et al.</i> (987)
Distribution Characteristics and Health Risk Assessment of Heavy Metals in Surface Water Around Electroplating Factories	YU Cong-cong, ZHAO Wei-tuo, GAO Xiao-feng, <i>et al.</i> (993)
Speciation and Ecological Risk of Heavy Metals in Surface Sediments from Jiulong River	LIN Cheng-qi, HU Gong-ren, YU Rui-lian, <i>et al.</i> (1002)
Fractionation and Contamination Assessment of Metal Elements in the Surface Sediments of Yundang Lagoon in Xiamen	YANG Qiu-li, YU Rui-lian, HU Gong-ren, <i>et al.</i> (1010)
Source Analysis, Spatial Distribution and Pollution Assessment of Heavy Metals in Sewage Irrigation Area Farmland Soils of Longkou City	LI Chun-fang, WANG Fei, CAO Wen-tao, <i>et al.</i> (1018)
Efficiency and Mechanism of Purifying High Iron-Manganese from Ground Water in the Cold Villages and Towns Based on The Coupling of Rice Husk and Iron-Manganese Oxidizing Bacteria	SUN Nan, CHEN Yan-li, ZHANG Ying, <i>et al.</i> (1028)
Peroxidation of High Algae-laden Water by Ozone; Algae Organic Matter Transformation and Disinfection By-products Formation	ZHANG Sai, HU Xue-bin, GU Li, <i>et al.</i> (1038)
Effects of Pretreatment on Hydraulic Irreversible Membrane Fouling During Ultrafiltration Short Process: A Pilot Study	YANG Hai-yan, XING Jia-jian, WANG Can, <i>et al.</i> (1046)
Fenton-like Catalytic Removal of Organic Pollutants in Water by Framework Cu in Cu-Al ₂ O ₃	XU Dan, ZHANG Li-li, LIU Li-fen (1054)
Oxidation Destruction of Cu(CN) ₂ ²⁻ by Persulfate	WANG Yun-fei, LI Yi-bing, WANG Yan-bin, <i>et al.</i> (1061)
Enhanced Removal of Herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid and Simultaneous Power Generation in Microbial Fuel Cells	QUAN Xiang-chun, QUAN Yan-ping, XIAO Zhu-tian (1067)
Adsorption Characteristics of Copper in Water by the Porous Biomorph-Genetic Composite of HAP/C with Eucalyptus Wood Template	LI Chao, ZHU Zong-qiang, CAO Shuang, <i>et al.</i> (1074)
Biological Toxicity Evaluation of Domestic Wastewater Based on A ² /O Treatment Processes Using a Battery of Bioassays	ZHANG Qiu-ya, MA Xiao-yan, WANG Xiao-chang, <i>et al.</i> (1084)
Effect of Wastewater Nitrogen Concentrations on Nitrogen Removal Ability of <i>Myriophyllum aquaticum</i>	MA Yong-fei, YANG Xiao-zhen, ZHAO Xiao-hu, <i>et al.</i> (1093)
Recovery Performance of ANAMMOX Process after Inhibition Resulting from Seawater	QI Pan-qing, YU De-shuang, LI Jin, <i>et al.</i> (1102)
Impact of Starvation Conditions on Biological Community Structure in Sulfur Autotrophic Denitrification Reactor	LI Fang-fang, SHI Chun-hong, LI Hai-bo, <i>et al.</i> (1109)
Quick Start-up of Anaerobic Ammonium Oxidation Process	LÜ Gang, XU Le-zhong, SHEN Yao-liang, <i>et al.</i> (1116)
A New Model for the Treatment of Low Ammonia Nitrogen Wastewater by CANON Process	WANYAN De-qing, YUAN Yi, LI Xiang, <i>et al.</i> (1122)
Effects of Side-stream Phosphorus Recovery on the Performance of EBPR System Under Low Dissolved Oxygen Condition	MA Juan, SONG Lu, YU Xiao-jun, <i>et al.</i> (1130)
Identification and Influence of Quorum Sensing on Anaerobic Ammonium Oxidation Process	CHEN Shu-han, LI An-jie, WANG Yue-xing, <i>et al.</i> (1137)
Effects of Organic Loading Rate on Startup Performance of Anaerobic Digestion with Vinegar Residues	DAI Xiao-hu, YU Chun-xiao, LI Ning, <i>et al.</i> (1144)
Influencing Mechanism of Calcium Peroxide Pre-treatment on Dewatering Performance of Waste Activated Sludge	BAI Run-ying, CHEN Zhan, ZHANG Wei-jun, <i>et al.</i> (1151)
Treatment Effects of Earthworm Constructed Wetlands in Different Working Conditions	DONG Meng-ke, LI Huai-zheng, XU Yi-xiao (1159)
Effect of PFOA on Oxidative Stress and Membrane Damage of <i>Escherichia coli</i>	YANG Meng, LI Yi, YE Jin-shao, <i>et al.</i> (1167)
Physicochemical Properties and Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles; A Comparison of Environmental and Laboratorial Conditions	YI Jun, CHENG Jin-ping (1173)
Pollution Characteristics of Chlorobenzenes in Organs of Fish from Typical Epidemic Areas of Schistosomiasis Prevalence	LI Kun, ZHAO Gao-feng, ZHOU Huai-dong, <i>et al.</i> (1182)
Effect of Nano Zeolite on Growth, Activity of Antioxidant Enzyme, and Chemical Fractions and Concentration of Cd in Chinese Cabbage	QIN Yu-li, XIONG Shi-juan, XU Wei-hong, <i>et al.</i> (1189)
Effect of Different Iron Minerals on Bioaccessibility of Soil Arsenic Using <i>in vitro</i> Methods	ZHONG Song-xiong, YIN Guang-cai, HUANG Run-lin, <i>et al.</i> (1201)
Enhanced Electrokinetic Remediation of Heavy Metals Contaminated Soils by Stainless Steel Electrodes as well as the Phenomenon and Mechanism of Electrode Corrosion and Crystallization	WEN Dong-dong, FU Rong-bing, ZHANG Wei, <i>et al.</i> (1209)
Influence of the Application of Non-Hazardous Sewage Sludge on the Evolution of Soil Carbon Pool and Carbon Pool Management Index	LIU Xiao, HUANG Lin, GUO Kang-li, <i>et al.</i> (1218)
Input and Distribution of Photosynthesized Carbon in Soil-Rice System Affected by Water Management and Nitrogen Fertilization	WANG Ting-ting, ZHU Zhen-ke, ZHU Han-hua, <i>et al.</i> (1227)
Effects of Simulated Acid Rain on Soil Respiration and Heterotrophic Respiration in a Secondary Forest	CHEN Shu-tao, SUN Lu, SANG Lin, <i>et al.</i> (1235)
Response of Soil Nitrifier and Denitrifier Community and Activity to Elevated Atmospheric CO ₂ Concentration and Temperature	LIU Yuan, WANG Guang-li, LI Lian-qing, <i>et al.</i> (1245)
Effects of Lithology on the Abundance and Composition of Soil Nitrogen-fixing Bacteria and Arbuscular Mycorrhizal Fungal Communities in Karst Shrub Ecosystem	LIANG Yue-ming, SU Yi-rong, HE Xun-yang, <i>et al.</i> (1253)
Characterization of Phosphorus Forms in Organic Composts and Their Effects on Leaf Phosphorus Content of <i>Castanea mollissima</i> in Chinese Chestnut Producing Area	SONG Ying, GUO Su-juan, ZHANG Li, <i>et al.</i> (1262)
Effects of Acidic Materials on the N Transformations During the Composting of Pig Manure and Wheat Straw	JIANG Ji-shao, YAO Qian (1272)