

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第37卷 第5期

Vol.37 No.5

2016

中国科学院生态环境研究中心 主办
科学出版社 出版



目次

2015年12月北京市空气重污染过程分析及污染源排放变化 薛亦峰,周震,聂滕,潘涛,齐璐,聂磊,王占山,李云婷,李雪峰,田贺忠(1593)

北京 APEC 期间大气颗粒物中类腐殖酸的污染特征及来源 周雪明,亓雪娇,项萍,谭吉华,段菁春,何晓明,贺克斌,马永亮(1602)

利用 SPAMS 分析北京市硫酸盐、硝酸盐和铵盐季节变化特征及潜在源区分布 刘浪,张文杰,杜世勇,侯鲁健,韩斌,杨文,陈敏东,白志鹏(1609)

兰州城区大气 PM_{2.5} 污染特征及来源解析 王新,聂燕,陈红,王博,黄韬,夏敦胜(1619)

成都市西南郊区春季大气 PM_{2.5} 的污染水平及来源解析 林瑜,叶芝祥,杨怀金,张菊,殷蔚雯,李晓芬(1629)

中亚热带背景区重庆四面山大气气态总汞含量变化特征 刘伟明,马明,王定勇,孙涛,魏世强(1639)

固定源排放污染物健康风险评价方法的建立 陈强,吴焕波(1646)

北京市典型燃烧源颗粒物排放水平与特征测试 胡月琪,邬晓东,王琛,梁云平,马召辉(1653)

南京公园降尘中重金属污染水平及风险评价 王呈,钱新,李慧明,孙一轩,王金霞(1662)

CoCuMnO₂ 光催化氧化多组分 VOCs 特性及其动力学 孟海龙,卜龙利,刘嘉栋,高波,冯奇奇,谭娜,谢帅(1670)

大辽河感潮河段及近岸河口氮、磷的分布及潜在性富营养化 张雷,曹伟,马迎群,韩超南,秦延文,赵艳民,刘志超,杨晨晨(1677)

典型温冰川区湖泊的稳定同位素空间分布特征 史晓宜,蒲焘,何元庆,陆浩,牛贺文,夏敦胜(1685)

利用 $\delta^{15}\text{N}-\text{NO}_3^-$ 和 $\delta^{18}\text{O}-\text{NO}_3^-$ 示踪北京城区河流硝酸盐来源 赵庆良,马慧雅,任玉芬,王效科,彭剑锋,贺成武,武俊良,刘梦贞,闫苗苗(1692)

柳江盆地浅层地下水硝酸盐分布特征及影响因素分析 王贺,谷洪彪,迟宝明,李海君,姜海宁(1699)

三峡库区小流域不同土地利用类型对氮素流失影响 陈成龙,高明,倪九派,谢德体,邓华(1707)

亚热带农区生态沟渠对农业径流中氮素迁移拦截效应研究 王迪,李红芳,刘锋,王毅,钟元春,何洋,肖润林,吴金水(1717)

平原河网典型污染物生物降解系数的研究 冯帅,李叙勇,邓建才(1724)

沉水植物对沉积物微生物群落结构影响:以洪泽湖湿地为例 张丁予,章婷曦,董丹萍,李德芳,王国祥(1734)

苏南水库硅藻群落结构特征及其控制因素 任杰,周涛,朱广伟,金颖薇,崔扬,许海,朱梦圆,夏明芳,陈伟民(1742)

河北衡水湖湿地汞污染现状及生态风险评价 王乃姗,张曼胤,崔丽娟,马牧源,颜亮,穆泳林,秦鹏(1754)

顺德水道土壤及沉积物中重金属分布及潜在生态风险评价 蔡怡敏,陈卫平,彭驰,王铁宇,肖荣波(1763)

台州电子垃圾拆解区水和沉积物中多溴联苯醚污染特征与生态风险 陈香平,彭宝琦,吕素平,陈强,张勇,黄长江,董巧香(1771)

乌江中上游段河水主要离子化学特征及控制因素 黄奇波,覃小群,刘朋雨,蓝芙宁,张连凯,苏春田(1779)

岩溶流域地下水 TOC 输出及影响因素分析:以重庆丰都雪玉洞地下河流域为例 王巧莲,蒋勇军,陈宇(1788)

广东英德宝晶宫洞穴滴水元素季节变化与影响因素 黄嘉仪,陈琳,陈琼,刘淑华,杨亮,童晓宁,贺海波,米小建,邓肖敏,彭小桃,李汉杰,杨琰,周厚云(1798)

基于 PCR-DGGE 和拟杆菌(*Bacteroides*) 16S rRNA 的岩溶地下水粪便污染源示踪研究:以重庆南山老龙洞地下河系统为例 张弘,蒋勇军,张远瞩,段逸凡,吕现福,贺秋芳(1805)

典型岩溶区地下河中溶解态脂类生物标志物来源解析及其变化特征 梁作兵,孙玉川,李建鸿,王尊波,谢正兰,张媚,廖昱,江泽利(1814)

钴活化过一硫酸盐氧化过程中卤代副产物的生成 刘阔,金浩,董为,季跃飞,陆隽鹤(1823)

天冬氨酸在氯化过程中生成消毒副产物二氯乙腈的研究 丁春生,李乃军,张涛,章梦青(1831)

臭氧氧化饮用水过程中可同化有机碳生成的影响因素 董秉直,张佳丽,何畅(1837)

污水管网典型混流制区域水量水质波动特征解析 程珣,张明凯,刘艳臣,施汉昌(1845)

HDTMA 改性沸石的制备及吸附废水中对硝基苯酚的性能和动力学 郭俊元,王彬(1852)

放射性废水处理中吸附剂的优势藻种筛选 李鑫,胡洪营,余骏一,赵文玉(1858)

微米 Fe₃O₄ 磁粉调理-压力电场污泥脱水工艺过程研究 钱旭,王毅力,赵丽(1864)

间歇曝气 SBR 处理养猪沼液的短程脱氮性能 宋小燕,刘锐,税勇,川岸朋树,占新民,陈吕军(1873)

不同灌溉方式对华北平原冬小麦土壤 CO₂ 和 N₂O 排放通量的影响 郭树芳,齐玉春,尹飞虎,彭琴,董云社,贺云龙,闫钟清(1880)

卫河新乡市区段春季溶解 CH₄ 与 N₂O 浓度特征 侯翠翠,张芳,李英臣,王奇博,刘赛(1891)

模拟氮沉降对内蒙古克氏针茅草原 N₂O 排放的影响 杨涵越,张婷,黄永梅,段雷(1900)

土壤呼吸与土壤有机碳对不同秸秆还田的响应及其机制 曹湛波,王磊,李凡,付小花,乐毅全,吴纪华,陆兵,徐殿胜(1908)

黑土丘陵区小流域土壤有机质空间变异及分布格局 高凤杰,马泉来,韩文文,单培明,周军,张少良,张志民,王宏燕(1915)

耕作方式对紫色水稻土团聚体中有机质及重金属的分布特征影响 史琼彬,赵秀兰,常同举,卢吉文(1923)

北京东南郊典型地层重金属分布特征与潜在生态风险 赵倩,马琳,刘翼飞,何江涛,李广贺(1931)

准东煤田露天矿区土壤重金属污染现状评价及来源分析 刘巍,杨建军,汪君,王果,曹月娥(1938)

纳米 TiO₂ 对土壤重金属释放及形态变化的影响 张金洋,王定勇,梁丽,李楚娟,张成,周雄,刘娟(1946)

纳米零价铁铜双金属对铬污染土壤中 Cr(VI) 的还原动力学 马少云,祝方,商执峰(1953)

低分子有机酸对硫杆菌活性的抑制作用及对土壤重金属脱除的影响 宋永伟,王鹤茹,曹艳晓,李飞,崔春红,周立祥(1960)

粒径和包裹物对纳米银在海洋微藻中的毒性影响 黄俊,衣俊,强丽媛,程金平(1968)

萱草修复石油烃污染土壤的根际机制和根系代谢组学分析 王亚男,程立娟,周启星(1978)

高温堆肥过程对猪粪来源抗生素抗性基因的影响 郑宁国,黄南,王卫卫,喻曼,陈晓旻,姚燕来,王卫平,洪春来(1986)

磺胺抗性消长与堆肥进程的交互特征 林辉,汪建妹,孙万春,符建荣,陈红金,马军伟(1993)

《环境科学》征订启事(1830) 《环境科学》征稿简则(1977) 信息(1698,1851,1992)

粒径和包裹物对纳米银在海洋微藻中的毒性影响

黄俊^{1,2}, 衣俊^{1,2}, 强丽媛¹, 程金平^{1,2*}

(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 518057)

摘要: 纳米银由于其独特的抗菌特性广泛应用于工商业领域。通过研究 3 种不同粒径和包裹物的纳米银对典型海洋微藻中肋骨条藻 (*Skeletonema costatum*) 的毒性效应, 进一步丰富纳米银对藻类毒性效应及其作用机制的认识。结果表明 3 种纳米银对硅藻细胞生长都有不同程度的生长抑制效应, 其毒性大小依次为 10 nm-OA > 10 nm-PVP > 20 nm-PVP。在细胞毒性方面, 相同粒径的聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 包裹的纳米银比油胺包裹 (OA) 的纳米银毒性更小; 而相同包裹物的 10 nm 和 20 nm 两种尺寸的纳米银的毒性效应主要取决于其在水环境中的粒径和浓度, 在浓度小于 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 大粒径的纳米银毒性更大; 在浓度 $\geq 500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 小粒径的纳米银毒性更大。在光合毒性方面, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 10 nm-PVP 显著上调 *3HfcpA* 的表达 ($P < 0.05$) 和显著下调 *DI* 的表达 ($P < 0.05$), 10 nm-OA 在浓度为 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 显著上调 *3HfcpA* 的表达 ($P < 0.05$), 而 20 nm-PVP 处理组没有显著性变化, 说明光合作用相关基因的表达对小粒径 PVP 包裹的纳米银更敏感。本研究结果表明, 纳米银对海洋微藻的毒性是由粒径大小、包裹物类型、暴露介质以及暴露浓度等多方面因素共同决定的。纳米银的粒径越小毒性越大, 粒径对纳米银的毒性效应影响很大; 而包裹物通过影响纳米银在水介质中的粒径大小间接影响纳米银的毒性效应。

关键词: 纳米银; 海洋微藻; 粒径效应; 包裹物效应; 毒性比较

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2016)05-1968-10 DOI: 10.13227/j.hjks.2016.05.047

Contribution of Particle Size and Surface Coating of Silver Nanoparticles to Its Toxicity in Marine Diatom *Skeletonema costatum*

HUANG Jun^{1,2}, YI Jun^{1,2}, QIANG Li-yuan¹, CHENG Jin-ping^{1,2*}

(1. State Key Laboratory of Estuarine and Coastal Research, East China Normal University, Shanghai 200062, China; 2. City University of Hong Kong Shenzhen Research Institute, Shenzhen 518057, China)

Abstract: Due to the unique antibacterial properties, silver nanoparticles (AgNPs) have been widely used in commercial applications. In this study, the toxicity of three kinds of AgNPs with different sizes and surface coatings to marine diatom *Skeletonema costatum* (*S. costatum*) was studied, which was one of the dominant species in estuarine and coastal areas. All three kinds of tested AgNPs inhibited the growth of exposed *S. costatum* under acute exposure condition, and the order of toxicity was 10nm-OA > 10nm-PVP > 20nm-PVP. Given the condition of similar particle size, oil amine surface coated AgNPs were more toxic than polyvinyl pyrrolidone (PVP) surface coated AgNPs in *S. costatum* in term of cytotoxicity. With the same surface coating, the toxicity of AgNPs in *S. costatum* was affected by its hydrodynamic diameter and exposure concentrations. When the concentration of AgNPs was less than 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, larger sized AgNPs showed greater toxicity; When the concentration was greater than or equal to 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, smaller AgNPs exhibited greater toxicity. At molecular level, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 10nm-PVP significantly upregulated expression level of *3HfcpA* ($P < 0.05$) and significantly downregulated expression level of *DI* ($P < 0.05$), and 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 10nm-OA significantly upregulated *3HfcpA* expression ($P < 0.05$), while 20nm-PVP treatment group didn't show any significant change. Exposed diatom demonstrated sensitive photosynthesis response to small size and PVP coated silver nanoparticles at molecular level. This study suggested that the toxicity of AgNPs to marine microalgae was largely controlled by the particle size, surface coating, exposure medium, exposure concentration and other factors. The smaller the particle size, the greater the toxicity of AgNPs, and the particle size of AgNPs played an important role in the toxicity of AgNPs in marine diatom *S. costatum*.

Key words: silver nanoparticles; marine microalgae; particle size effects; surface coating effects; toxicity comparison

纳米银 (AgNPs) 是目前应用最广泛、发展最快的一类纳米材料, 由于独特的抗菌特性广泛用于传统行业和一些新兴领域, 如涂料、食品、纺织、化妆品、水质净化、医疗等^[1-3]。截止 2013 年 10 月, 纳米技术消费品目录包含 1 628 种产品, 比 2010 年增加了 24%, 其中纳米银相关产品占到 383 种 (www.nanotechproject.org)。纳米银大规模商业化应用在创造巨大经济效益的同时, 也存在通过各种途径进

入环境的风险, 其生物毒性和环境效应一直是人们关注的焦点。Benn 等^[4]发现市面上 6 种含有纳米

收稿日期: 2015-10-26; 修订日期: 2015-12-14

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); 河口海岸学国家重点实验室自主课题项目 (2012RCDW-01)

作者简介: 黄俊 (1989 ~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为海洋生态毒理学, E-mail: huangjun901@sina.com

* 通讯联系人, E-mail: jinpingsheng@gmail.com

银的袜子洗涤后释放到水中银的浓度高达 $1\ 300\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。一旦纳米银释放进入水环境中, 零价态的纳米银可能氧化释放毒性更强的银离子或仍以纳米银的形式存在, 造成水体和沉积物持久性污染^[5]。据估计英国每年有 $8.8\ \text{t}$ 的纳米银从相关产品中释放进入废水系统, 下水道污泥成为一个最主要归宿, 当这些污泥用于农业生产时又成为新的污染源^[6]。Gottschalk 等^[7]模型预测结果显示欧洲污水处理厂污泥和河流沉积物中的纳米银含量分别是 $1\ 581\ \text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $952\ \text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$, 美国分别是 $662\ \text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $195\ \text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。Chinnapongse 等^[8]发现一些纳米银能长时间保持稳定最终进入河口淡水或海洋系统, 而它们对浮游植物群落的生态毒性并不十分清楚。

纳米银的毒性由多种因素共同决定的, 主要包括粒径大小、包裹物类型、杂质多少、表面电荷、形态结构和银离子溶出速率等^[9-11]。聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinyl pyrrolidone) 和油胺 (oil amine) 是稳定性极好的表面活性剂, 广泛应用于金、银等金属纳米材料的制备, 纳米银常用的稳定剂有柠檬酸钠 (27%)、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP, 18%)、胺类 (8%) 等^[12]。Pang 等^[13]发现纳米银的毒性高度依赖纳米银的表面电荷, 其中 PVP 包裹纳米银的毒性小于柠檬酸钠包裹的纳米银, 但大于聚乙二醇包裹的纳米银。在自然含氧水中, PVP 和单宁酸包裹的纳米银比柠檬酸包裹的纳米银更容易释放银离子, 而且大粒径的纳米银比小粒径的纳米银更耐溶解并持续释放银离子^[5, 14]。Xiu 等^[15]研究聚乙二醇和 PVP 包裹的纳米银对大肠杆菌的毒性, 发现包裹物主要通过影响银离子释放而间接影响抑菌效果。大量研究表明纳米银具有潜在的生物毒性作用, 并且粒径越小毒性越大^[16, 17]。Ivask 等^[18]发现 $20\sim 80\ \text{nm}$ 的纳米银对水生生物的毒性依赖于溶解银离子含量, 粒径越大毒性越小; 而粒径小于等于 $10\ \text{nm}$ 的纳米银因与细胞接触机会更多, 具有更高的生物利用度和更强的毒性。Matorin 等^[19]发现纳米银在低浓度下显著抑制莱茵衣藻光合系统 II (PS II) 电子传递的活性和增加非还原醌的含量, 进而抑制光合作用。虽然纳米银在细胞毒性方面已经有一些研究, 但深入比较研究纳米银自身的理化参数以及水环境行为对其毒性影响的较少。

海洋微藻是海洋生态系统的主要初级生产者, 具有易培养、繁殖快、对环境毒物敏感等优点, 常作为实验材料用于化学品毒性测试。由于适应低光照度、低温度和广盐性环境, 中肋骨条藻广泛分布

在全球近海和河口水域^[20]。中肋骨条藻作为浮游植物群落的优势藻种, 在适宜条件下极易形成赤潮^[21, 22], 对研究近海海洋生态环境具有重要意义。本文在研究纳米银理化参数及其水环境行为的基础上, 以河口近岸海域广分布的优势藻中肋骨条藻为受试生物, 在细胞和基因两个层次上探讨比较不同包裹物和粒径的纳米银对藻细胞的急性毒性效应, 对评价纳米银的生态风险、监测海洋环境以及赤潮生物种群的变化具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验仪器与材料

仪器: 恒温光照培养箱 (MGC-800BP-2, 上海一恒), 电子分析天平 (BSA124S, 德国 Sartorius), 超声波清洗仪 (SB-520DTDN, 宁波新芝), YSI 多参数水质分析仪 (YSI30, 美国维赛), 立式压力蒸汽灭菌器 (LDZX-50KBS, 上海申安), 透射电子显微镜 (JEM-2100, 日本 JEOL), 动态光散射仪 (DLS, Nano-ZS90, 英国 Malvern), 微量紫外分光光度计 (SMA4000, 美国 Merioton), 实时定量 PCR 仪 (ABI 7500, 美国 Applied Biosystems) 及其他实验器材。

试剂: $10\ \text{nm}$ 油胺包裹的纳米银粉 (型号 CST-NP-S10, $10\ \text{nm-OA}$)、 $10\ \text{nm}$ 聚乙烯吡咯烷酮包裹的纳米银粉 (型号 CST-NP-S10, $10\ \text{nm-PVP}$) 和 $20\ \text{nm}$ 聚乙烯吡咯烷酮包裹的纳米银分散在异丙醇制备成 $10\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的纳米银悬浮液 (型号 CST-NP-S20, $20\ \text{nm-PVP}$), 3 种纳米银均购自苏州冷石纳米材料科技有限公司, 纯度为 99.5%; 其他化学药品和试剂 (分析纯) 均购自于上海国药集团化学试剂有限公司。实验的玻璃和塑料器皿使用前用 10% HNO_3 浸泡 $24\ \text{h}$ 。

1.2 藻种培养

实验藻种为中肋骨条藻 (*S. costatum*, 编号 CCMA-227), 由厦门大学近海海洋国家重点实验室海洋藻类保种中心提供。藻株于 2010 年 5 月采集分离自东海长江口海域, 藻种经活化后用于后续实验。人工海水参照文献 [23] 的配方配制, 充分曝气后, 调整 pH 至 $7.8\sim 8.4$, 盐度为 28。经过 $0.45\ \mu\text{m}$ 醋酸纤维酯滤膜过滤后, 高压蒸汽灭菌 ($121\ ^\circ\text{C}$, $20\ \text{min}$), ($f/2 + \text{Si}$) 海水培养基^[24]按照 1:1 000 的比例将营养液加入到灭菌海水中。中肋骨条藻按照 1:9 的比例接种到新鲜培养基中, 置于恒温光照培养箱中培养, 光强 $6\ 000\ \text{lx}$, 光暗比 $14\ \text{h}:10\ \text{h}$, 温度 (20 ± 1) $^\circ\text{C}$, 每日定时摇瓶 3 次。暴露实验之前用细胞计

数板测定藻细胞密度,并用加富的灭菌海水培养基调整至 0.8×10^9 个 $\cdot L^{-1}$ 。

1.3 纳米银的表征

准确称取一定质量的纳米银,将其分散在 Milli-Q 水和 f/2 培养基中,40 kHz 下超声分散 30 min,配制成浓度为 $5 g \cdot L^{-1}$ 的悬浮液再稀释到 $10 mg \cdot L^{-1}$ 。取少量分散好的纳米银悬浮液滴在 300 目的铜网上,37°C 恒温干燥 2 h 后,用透射电子显微镜对纳米银的粒径大小进行表征。取少量纳米银粉用扫描电子显微镜观察形貌特征,并用动态光散射仪(DLS)测定纳米银的水动力粒径和电动电势。

1.4 藻形态观察

纳米银质量浓度设置为 0、5、50、500 $\mu g \cdot L^{-1}$ 一共 4 组梯度,每组设置 3 个平行,无菌 Milli-Q 水作为空白对照。用移液枪准确移取 4 mL 对数生长期的藻液到 12 孔板中,纳米银暴露 24 h 后,选择浓度为 500 $\mu g \cdot L^{-1}$ 的藻细胞,在光学显微镜下观察藻细胞的形态变化。

1.5 藻细胞存活率

取 200 μL 暴露藻液于 96 孔酶标板中,加 20 μL 浓度为 $5 mg \cdot mL^{-1}$ 的噻唑蓝(MTT)溶液,室温黑暗孵育 4 h 后离心 5 min,弃上清液,加 200 μL 二甲亚砜(DMSO)溶解。用酶标仪在 570 nm 和 630 nm 处检测各组的吸光度,对照组吸光度设置为 100%,计算藻细胞的存活率。

1.6 ROS 含量检测

藻细胞内的 ROS 含量用活性氧检测试剂盒(碧云天生物技术研究所在 2,7-二氯荧光素酶(DCFH-DA)法进行测定。每组分别取 200 μL 暴露藻液于 96 孔黑色酶标板中,离心 5 min 后,弃上清液,加入

40 μL 的 $10 \mu mol \cdot L^{-1}$ DCFH-DA,在 37°C 孵育 30 min。细胞外的 DCFH-DA 用 f/2 培养基洗涤两次,再加入 200 μL 的 f/2 培养基,阳性对照组加入等量的氧化剂(Rosup, $1 mg \cdot L^{-1}$)。15 min 后用酶标仪在 488 nm 激发波长和 525 nm 发射波长下检测各组的荧光强度,对照组荧光强度设置为 100%,计算 ROS 含量。

1.7 叶绿素 a 含量测定

采用 90% 丙酮萃取叶绿素 a,准确移取 2 mL 藻液于离心管中,4°C、8 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 5 min,弃上清液。然后每管加入 1 mL 90% 丙酮,置于 4°C 冰箱避光萃取 24 h 后,4°C、8 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 5 min,取上清液,用分光光度计在 664 nm 和 630 nm 处测定吸光度值,按照 Jeffrey 等^[25]的公式计算:

$$\text{Chlorophyll a} = 11.47 \times A_{664} - 0.4 \times A_{630} \quad (1)$$

1.8 光合作用相关基因表达

低速离心收集约 10^7 个中肋骨条藻细胞的样品,液氮速冻后 -80°C 冻存,用液氮研磨破碎藻细胞;RNA 分离与纯化使用 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒(Sangon),用 PrimeScript™ RT reagents with gDNA Eraser 试剂盒(TaKaRa)将 RNA 反转录为 cDNA,按照 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒(TaKaRa)进行实时荧光定量 PCR。反应程序为:95°C 预变性 30 s,随后 95°C 变性 5 s 和 60°C 延伸 34 s,共 40 个循环周期,然后用溶解曲线检验产物的专一性。本研究所用引物由上海生工生物工程有限公司合成,引物序列见表 1。以 *18s* 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法^[26]计算目的基因的相对表达量,即实验组目的基因的表达相对于对照组的表达量的变化倍数。

表 1 中肋骨条藻相关基因的引物序列

Table 1 Primer sequences used in gene expression studies of *S. costatum*

基因名称	缩写	来源	上游引物(5'端)	下游引物(3'端)	文献
Fucoanthin-chlorophyll a/c light harvesting protein	<i>3HfcpA</i>	NCBI U66183	CTCCCTCCAGGTTCTGTTG	AGCGAGCTCAAGGAATCCAA	[27]
Fucoanthin-chlorophyll a/c light harvesting protein	<i>3HfcpB</i>	NCBI U66184	AGTTCGATGAGGAGACCAAGCT	GGCACGTCCGTTGTTCAAC	[27]
Photosystem II reaction center D1 protein	<i>D1</i>	NCBI HM449711	ACCACCAATACACCAGCAAC	GCCTCTTGGATTTTCGTAGC	[28]
Ribosomal RNA 18S	<i>18s</i>	NCBI HM449712	CATTGTCAGAGGTGAAATCTTGGGA	CCCCGGAACCCAAAAGT	[28]

1.9 数据处理及分析

纳米银的粒径参照比例尺用 ImageJ2x 软件测量,Excel 统计后用 Origin 8.0 软件制图。每组实验浓度设置 3 个平行($n=3$),所有实验数据均采用平

均值 \pm 标准偏差表示。实验数据用 GraphPad Prism 5.0 软件进行单因素方差分析及显著性 Dunnett-*t* 检验,结果的显著性差异分别以(* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 和 *** $P < 0.001$)来表示。

2 结果与分析

2.1 3 种纳米银的透射电镜和扫描电镜表征分析

图 1 分别代表 20 nm-PVP、10 nm-PVP 以及 10 nm-OA 这 3 种纳米银分散在 Milli-Q 水中的透射电镜照片. 图 1(a) 显示 20 nm-PVP 纳米银颗粒由于团聚有重叠且略不规则球形, 粒径为 20

nm 左右; 图 1(b) 显示 10 nm-PVP 大部分纳米银颗粒呈椭圆形且分散均匀, 粒径为 10 nm 左右; 图 1(c) 显示 10 nm-OA 的纳米银呈球形且团聚明显, 粒径为 10 nm 左右. 透射电镜结果显示 3 种纳米银在 Milli-Q 水中分散比较均匀, 纳米银形态大致呈球形, 粒径大小符合正态分布, 且粒径越小越容易发生团聚.

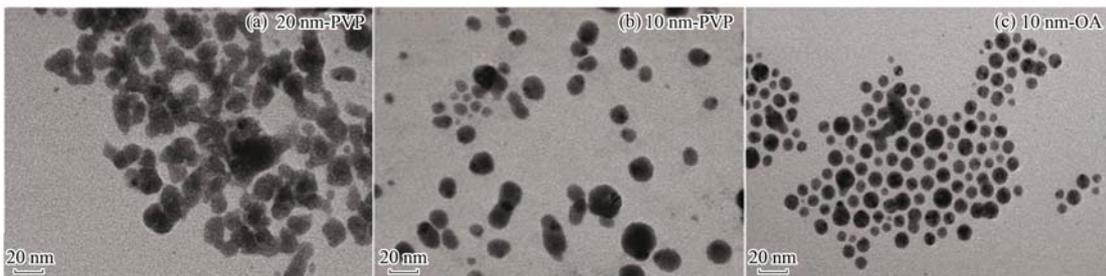


图 1 3 种纳米银的透射电镜表征

Fig. 1 Representative transmission electron microscopy (TEM) images of three kinds of AgNPs in Milli-Q water

图 2 分别为 20 nm-PVP、10 nm-PVP 以及 10 nm-OA 这 3 种纳米银在干粉状态下的扫描电镜图. 图 2(a) 显示 20 nm-PVP 的纳米银呈灰白色椭圆形, 大粒径占绝大多数; 图 2(b) 显示 10 nm-PVP 的纳米银呈灰白色球形, 粒径较小且大小基本一致; 图 2(c) 显示

10 nm-OA 纳米银颗粒团聚在一起呈块状并被包裹物完全覆盖. 从纳米银颗粒的形貌特征分析, 10 nm-PVP 和 20 nm-PVP 拥有相同的包裹物, 类型明显不同于 10 nm-OA 的包裹物. 扫描电镜结果说明 PVP 包裹的纳米银比油胺包裹的纳米银分散性更好.

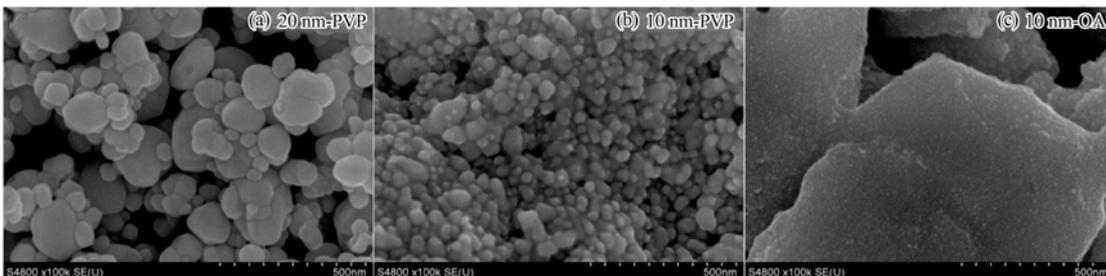


图 2 3 种纳米银的扫描电镜表征

Fig. 2 Representative scanning electron microscopy (SEM) images of three kinds of AgNPs powder

2.2 3 种纳米银的粒径参数表征分析

选取 3 种纳米银在 Milli-Q 水分散介质中有代表性的透射电镜图, 每种纳米银的粒径分布分别统计 140 个纳米银颗粒的直径. 结果如下: 10 nm-OA 粒径为 (8.27 ± 1.80) nm; 20 nm-PVP 粒径为 (11.20 ± 3.44) nm; 10 nm-PVP 粒径为 (18.20 ± 3.98) nm. 3 种纳米银的粒径大小符合正态分布 (图 3), 10 nm 的两种纳米银中值粒径略有差异, 但与 20 nm-PVP 中值粒径相比差异显著.

表 2 列出了 3 种纳米银在 Milli-Q 水和 $f/2$ 培养基中的水动力粒径和电动电势变化. 纳米银在 $f/2$ 培养基中水动力粒径明显大于 Milli-Q 水中, 10 nm-PVP 和 10 nm-OA 两种纳米银的水动力粒径较大且

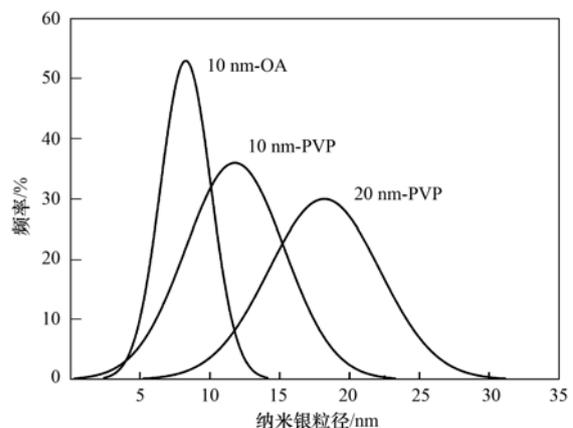


图 3 3 种纳米银在 $f/2$ 培养基中的粒径分布

Fig. 3 Size distribution of three kinds of AgNPs in $f/2$ medium

比较接近,而 20 nm-PVP 在 f/2 培养基中的水动力粒径变化不大,说明纳米银粒径越小越容易发生团聚. 其中 10 nm-PVP 的中值粒径最大为 142 nm; 而 20 nm-PVP 在两种分散介质中的水动力粒径变化不大,在 f/2 培养基中的水动力粒径明显小于 10 nm 的两种纳米银.

3 种纳米银在 Milli-Q 水中的电动电势明显小于在 f/2 培养基中,其中 10 nm-PVP 在 Milli-Q 水中的电动电势最小为 (-39.8 ± 7.71) mV, 而

在 f/2 培养基中 3 种纳米银的电动电势趋于一致. 纳米银在两种介质中的电动电势与水动力粒径变化趋势一致,由于电动电势越低粒子越不稳定,说明纳米银在 f/2 培养基中发生不同程度的团聚. 电镜表征结果显示 10 nm 的两种纳米银的中值粒径略有差异,但这两种纳米银在 f/2 培养基中的水动力粒径比较接近,说明包裹物对纳米银在水介质中粒径大小有不同影响,进而间接影响纳米银的毒性.

表 2 3 种纳米银在水介质中的水动力粒径及其电动电势

Table 2 The z-average hydrodynamic diameter and zeta potential of the three kinds of AgNPs in water

纳米银	水动力粒径/nm		电动电势/mV	
	Milli-Q 水	f/2 培养基	Milli-Q 水	f/2 培养基
10 nm-OA	99.60 ± 32.58	441.3 ± 81.24	-12.3 ± 6.52	-1.94 ± 0.76
10 nm-PVP	142.0 ± 75.64	392.4 ± 49.68	-39.8 ± 7.71	-1.61 ± 3.46
20 nm-PVP	70.96 ± 49.26	94.09 ± 65.61	-8.59 ± 7.95	-5.96 ± 2.72

2.3 纳米银粒径和包裹物对藻细胞存活率的影响

中肋骨条藻暴露于 3 种纳米银 24 h 后,藻细胞的存活率随着纳米银浓度的升高而减少(图 4). 在纳米银浓度 $\geq 5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,10 nm-OA 处理组藻细胞存活率显著减少($P < 0.001$); 在纳米银浓度 $\geq 500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,10 nm-PVP 和 20 nm-PVP 处理组藻细胞存活率都显著减少($P < 0.001$). 相同粒径不同包裹物的两种纳米银在对藻细胞毒性方面,10 nm-OA 的毒性大于 10 nm-PVP. 说明 PVP 比油胺更能降低纳米银的毒性. 而相同包裹物的两种纳米银对藻细胞毒性随纳米银浓度不同而差异很大. 在纳米银浓度小于 $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,20 nm-PVP 的毒性大于 10 nm-PVP; 在纳米银浓度 $\geq 500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,20 nm-PVP 的毒性小于 10 nm-PVP,说明纳米银的毒性大小取决于纳米银的水动力粒径和暴露浓度.

2.4 纳米银粒径和包裹物对藻细胞形态的影响

3 种纳米银对藻细胞存活率结果表明,纳米银在 $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时能显著降低藻细胞的存活率. 图 5 显示了对照组和 $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 不同纳米银处理组藻细胞的形态学变化,红色箭头标注为死亡藻细胞的硅质外壳,黄色箭头标注为死亡的藻细胞碎片. 结果显示 10 nm-PVP 和 10 nm-OA 纳米银毒性大于 20 nm-PVP 纳米银,死亡的藻细胞数量也更多,并且出现大量死亡的藻细胞碎片. 在对藻细胞形态损伤方面,粒径大小是纳米银毒性的主要因素,而且粒径越小毒性越大.

2.5 纳米银粒径和包裹物对藻细胞活性氧含量的影响

中肋骨条藻暴露于 PVP 包裹的两种纳米银 24 h 后,藻细胞内活性氧的含量随着纳米银的浓度升高而减少(图 6). 在浓度 $\geq 500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,10 nm-PVP 处理的藻细胞内活性氧含量显著减少($P < 0.01$); 在浓度 $\geq 50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,20 nm-PVP 处理的藻细胞内活性氧含量显著减少($P < 0.05$). 说明 PVP 包裹的纳米银能够减少对藻细胞的氧化损伤,而且纳米银粒径越小毒性减小得越多. 此外,中肋骨条藻暴露于 10 nm 油胺包裹的纳米银 24 h 后,藻细胞内活性氧的含量随着纳米银的浓度升高而增加,在浓度 $\geq 500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,藻细胞内活性氧含量显著升高($P < 0.001$). 油胺和 PVP 包裹的纳米银对藻细胞氧化应激和氧化损伤效应结果表明,10 nm 油胺包裹的纳米银通过诱导藻细胞产生过多的活性氧而具有更强的细胞毒性.

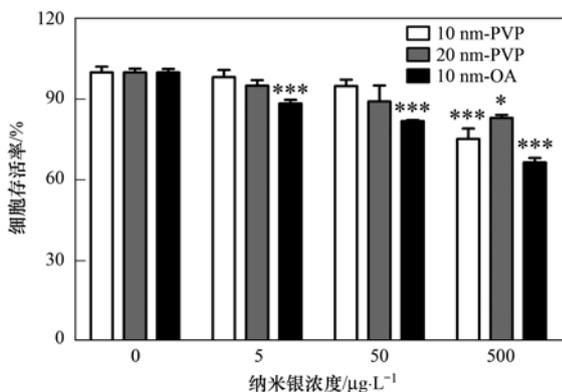


图 4 不同包裹物和粒径的纳米银对中肋骨条藻细胞存活率的影响

Fig. 4 Cell viability of *S. costatum* upon exposure to AgNPs with different surface coatings and particle sizes for 24 h

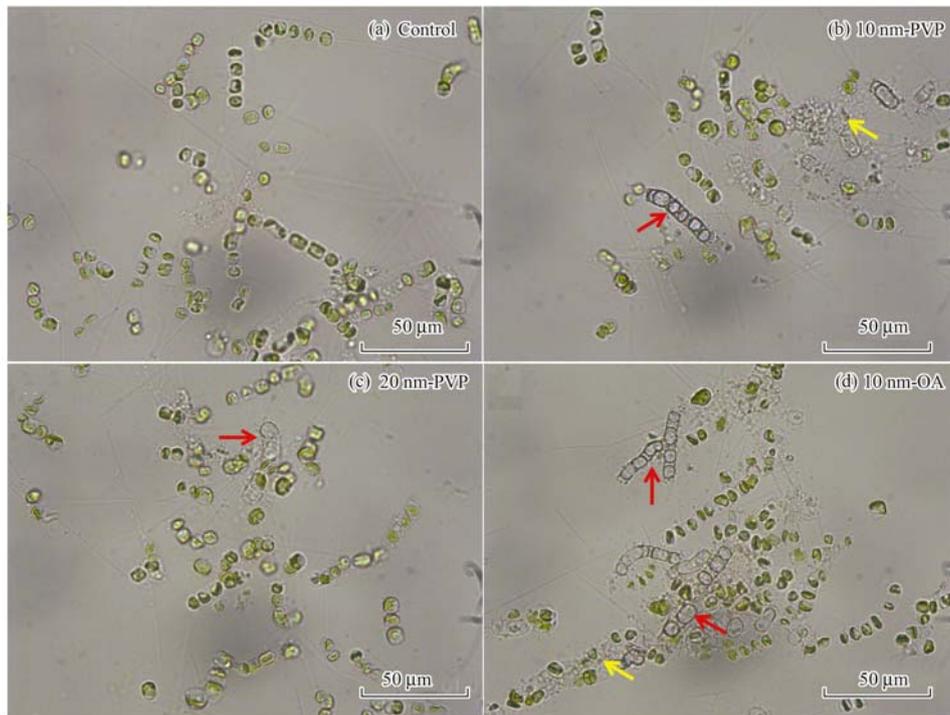


图 5 中肋骨条藻在 500 µg·L⁻¹ 纳米银暴露下形态学变化

Fig. 5 Cell morphological changes of *S. costatum* after exposure to 500 µg·L⁻¹ AgNPs for 24 h

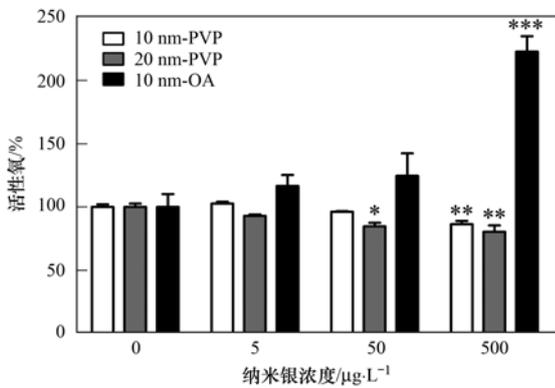


图 6 不同包裹物和粒径的纳米银对中肋骨条藻活性氧的影响

Fig. 6 Induction of ROS in *S. costatum* after exposed to AgNPs with different surface coatings and particle sizes for 24 h

2.6 纳米银粒径和包裹物对藻细胞叶绿素 a 含量影响

中肋骨条藻暴露于 10 nm-PVP 和 10 nm-OA 纳米银 24 h 后, 10 nm-OA 处理组藻细胞叶绿素 a 含量随着纳米银的浓度升高而增加, 在浓度 ≥ 50 µg·L⁻¹ 时, 叶绿素 a 含量显著升高 ($P < 0.05$). 中肋骨条藻暴露于 10 nm-PVP 和 20 nm-PVP 纳米银 24 h 后, 藻细胞叶绿素 a 含量随着纳米银浓度的升高而减少 (图 7). 在浓度 ≥ 50 µg·L⁻¹ 时, 10 nm-PVP 处理组藻细胞叶绿素 a 含量显著减少 ($P < 0.01$); 在浓度 ≥ 500 µg·L⁻¹ 时, 20 nm-PVP 处理组

藻细胞叶绿素 a 含量显著减少 ($P < 0.01$). 而 10 nm-OA 和 10 nm-PVP 对藻细胞叶绿素 a 含量影响差异显著, 10 nm-OA 处理组藻细胞叶绿素 a 含量增加, 10 nm-PVP 则降低了藻细胞叶绿素 a 含量. 结果表明相同包裹物条件下, 纳米银粒径越小藻细胞叶绿素 a 含量减少得越明显.

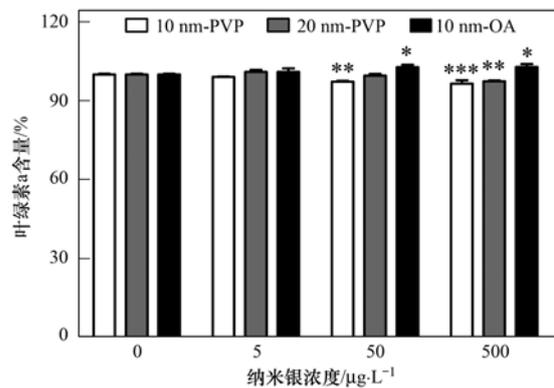


图 7 不同包裹物和粒径的纳米银对中肋骨条藻叶绿素 a 含量的影响

Fig. 7 Change of chlorophyll a content in *S. costatum* upon exposure to AgNPs with different surface coatings and particle sizes for 24 h

2.7 纳米银暴露对藻细胞光合作用基因表达的影响

中肋骨条藻暴露于 3 种纳米银 24 h 后, 结果表明 10 nm-PVP 和 10 nm-OA 处理组藻细胞光合作用

基因的表达量变化显著,而 20 nm-PVP 处理组没有显著性变化(图 8). *3HfcpA* 基因随着纳米银浓度升高有上调的趋势,10 nm-OA 处理组在浓度 $\geq 500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时显著上调($P < 0.01$),而 10 nm-PVP 处理组在浓度 $\geq 50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时显著上调($P < 0.05$). *3HfcpB* 与 *3HfcpA* 基因是同源基因,其变化与 *3HfcpA* 基因相反,随着 10 nm-PVP 和 10 nm-OA 浓度升高有下调的趋势. 中肋骨条藻 PS II 中心反应蛋白 *DI* 基因的表达明显受到纳米银的抑制,10 nm-PVP 和 10 nm-OA 处理组藻细胞 *DI* 基因随纳米银浓度的升高有下调的趋势,其中 10 nm-PVP 在浓度 $\geq 50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时显著下调($P < 0.05$). 纳米银粒径越小对

光合作用相关基因表达的影响越显著,而相同粒径条件下,PVP 比油胺包裹的纳米银更显著诱导藻细胞光合作用基因变化,说明小粒径 PVP 包裹的纳米银对光合作用基因的影响最大.

3 讨论

3.1 纳米银毒性的影响因素

影响纳米银在水环境中稳定性的因素都会影响到纳米银对藻类的细胞毒性,这些因素不仅包括材料本身特性(形状大小、包裹物类型、贮存状态),还与分散剂和环境因素(pH、离子强度、离子成分、溶解性有机物等)有关^[9, 29]. 3 种纳米银的电镜表征结果表明,纳米银颗粒呈椭球形且大小均匀,因而具有极大的比表面积. 另外,DLS 数据表明纳米银在 Milli-Q 水和 f/2 培养基两种介质中均有不同程度的团聚,水动力粒径和电动电势差别很大. 许多纳米材料由于大的比表面积和强的吸附能力,极易发生团聚或吸附在藻细胞表面,形成物理遮蔽或细胞接触而产生毒性,如纳米 TiO_2 ^[30]. 纳米银的水动力粒径随着水环境中离子浓度升高而粒径增大,电动电势也表现出相同的趋势(表 2),从侧面证实纳米银团聚后稳定性降低. 由于 20 nm-PVP 分散在异丙醇溶剂中储存,因而具有良好的分散效果,在水环境介质中水动力粒径变化不大,在一定程度上增强纳米银的毒性. 而 10 nm-PVP 和 20 nm-PVP 两种纳米银在 f/2 培养基中的水动力粒径大小和电动电势的明显差异,说明小粒径的纳米银颗粒之间的相互作用力更强,在海水环境中更容易发生团聚,这在一方面解释了纳米银的团聚行为对藻细胞毒性的影响. 此外,纳米银的浓度和粒径大小对藻细胞毒性具有条件限制作用,当纳米银浓度小于 $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,大粒径的纳米银毒性更大;在浓度 $\geq 500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,小粒径的纳米银毒性更大. 本研究主要在氧化损伤和光合作用两个方面比较了 3 种纳米银对藻细胞的毒性差异,纳米银对藻细胞的可能毒性机制还有溶解释放银离子^[31]和生物富集^[32]等途径,这有待进一步研究.

3.2 纳米银对藻细胞的氧化损伤效应

通过比较 3 种纳米银对藻细胞存活率和形态的影响,发现中肋骨条藻细胞存活率与细胞内活性氧的积累呈负相关,说明氧化损伤效应是纳米银对藻细胞毒性的主要途径之一. 大量研究结果也证实纳米银是通过诱导产生过多的活性氧发挥细胞毒性并抑制藻细胞的生长^[33, 34]. 3 种纳米银的毒性大小依

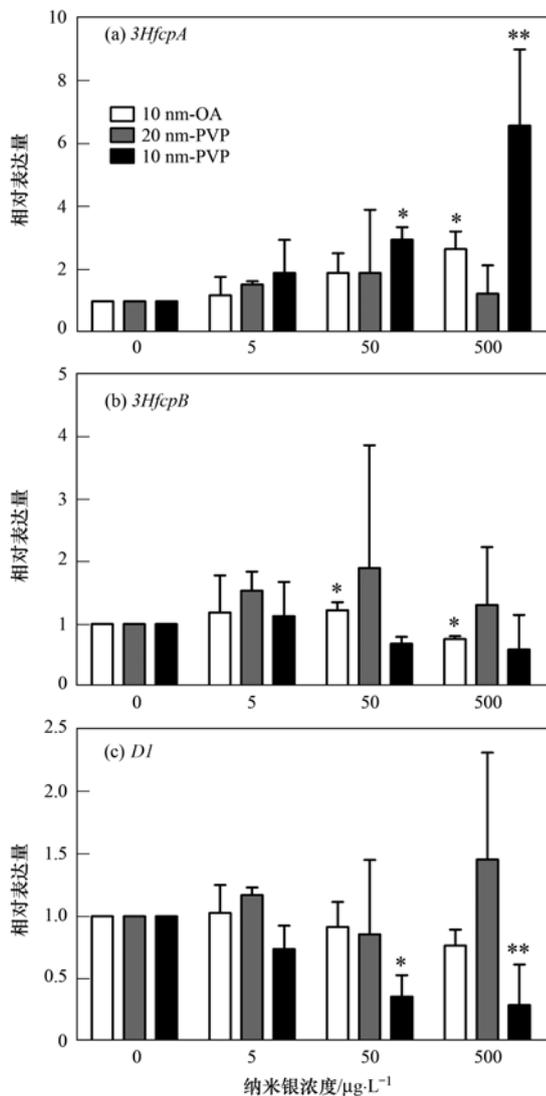


图 8 不同包裹物和粒径的纳米银对中肋骨条藻光合作用相关基因表达水平的影响

Fig. 8 Expression changes of photosynthesis relevant gene in *S. costatum* following exposure to AgNPs with different surface coatings and particle sizes for 24 h

次为 10 nm-OA > 10 nm-PVP > 20 nm-PVP, 说明纳米银的毒性主要取决于粒径大小. 在对藻细胞氧化损伤方面, 发现油胺包裹的纳米银显著诱导藻细胞产生过多的活性氧, 而 PVP 包裹的纳米银处理组藻细胞内活性氧水平有显著性减少, 说明 PVP 能够降低纳米银的生物毒性. 关于 PVP 包裹纳米银的大量毒理研究表明^[35, 36], PVP 包裹的纳米银较柠檬酸包裹的纳米银化学结构更稳定, 而且在环境介质中银的溶解速率更小, 因而具有更小的生物毒性, 说明 PVP 包裹的纳米银更安全. 在对藻细胞叶绿素 a 含量影响方面, 10 nm-PVP 和 10 nm-OA 在 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 下引起叶绿素 a 含量显著性变化, 而 20 nm-PVP 处理组在 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 下出现显著性变化, 说明小粒径纳米银对藻细胞叶绿素 a 含量影响显著, 叶绿素可能是纳米银毒性的一个重要靶点. Li 等^[30] 对纳米 TiO_2 研究已经证实藻细胞叶绿体是活性氧产生和积累的位点, 这在另一方面说明纳米银通过影响叶绿素 a 含量和活性氧含量并影响光合作用过程.

3.3 纳米银对藻细胞光合作用的毒性影响

光合作用是藻类最重要的生命活动, 目前对藻类在不同纳米银下分子水平的基因表达变化情况所知甚少. 在对中肋骨条藻光合作用相关基因表达的研究发现, 3 种纳米银处理下藻细胞叶绿素捕光蛋白基因 *3HfcpA*、*3HfcpB* 和 PS II 的中心反应蛋白基因 *D1* 均出现显著性变化, 10 nm-PVP 和 10 nm-OA 两种纳米银对光合作用基因的干扰最严重, 而 20 nm-PVP 处理组没有显著性变化. 同源基因 *3HfcpA* 和 *3HfcpB* 主要参与光反应中捕光蛋白的合成^[27], *3HfcpA* 基因的上调表达引起 *3HfcpB* 基因的下调表达, 这可能是藻细胞在受到纳米银胁迫后的一种光保护机制, 说明纳米银影响了藻细胞对光的吸收过程. 10 nm-PVP 和 10 nm-OA 处理组藻细胞 *D1* 基因表达显著下调, 说明 PS II 的中心反应蛋白 *D1* 合成受阻. Ali 等^[37] 研究表明重金属铬诱导 PS II 功能活性的变化和活性氧的形成与 *D1* 蛋白的含量减少高度相关. 也有研究发现植物细胞在强光胁迫下可能引起 *D1* 蛋白的损伤^[38], *D1* 蛋白的破坏可能导致 PS II 反应中心结构和功能的损害, 继而引起光合电子传递的受阻, 进而抑制光合作用的正常进行^[39]. 因此, 纳米银对藻细胞的另外一个毒性途径可能是通过调控光合作用关键蛋白质的合成, 干扰光吸收和 PS II 电子传递等过程, 进而抑制光合系统活性和藻细胞生长. 本研究表明, 纳米银对中肋骨条藻的细胞毒性和基因毒性呈现一致性, 并且粒径大小是

纳米银毒性的主要因素, 而且 PVP 这种包裹物比油胺更能降低纳米银的毒性. 关于 PVP 和油胺这两种包裹物与纳米银的结合方式以及如何与藻细胞相互作用的机制方面还需要深入研究.

4 结论

(1) 纳米银对中肋骨条藻的生长有抑制作用并呈现明显的剂量效应关系, 其毒性大小依次为 10 nm-OA > 10 nm-PVP > 20 nm-PVP.

(2) 纳米银的粒径越小对中肋骨条藻的细胞毒性越大, 此外, 水环境中纳米银的粒径和有效浓度是影响其毒性的重要因素.

(3) 包裹物通过影响纳米银在水环境中的稳定性间接影响纳米银的毒性, 其中聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 比油胺 (OA) 更能降低纳米银的生物毒性.

(4) 通过比较 3 种纳米银对中肋骨条藻细胞毒性的影响, 发现藻细胞存活率与细胞内活性氧的积累呈负相关关系, 而且小粒径纳米银显著诱导 *D1* 基因下调表达进而抑制光合作用, 说明活性氧介导的氧化损伤和对光合作用关键基因调控是纳米银对藻细胞可能的毒性作用机制.

参考文献:

- [1] Lalley J, Dionysiou D D, Varma R S, *et al.* Silver-based antibacterial surfaces for drinking water disinfection-an overview [J]. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 2014, **3**: 25-29.
- [2] Tang B, Wang J F, Xu S P, *et al.* Application of anisotropic silver nanoparticles; multifunctionalization of wool fabric [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2011, **356**(2): 513-518.
- [3] Chaloupka K, Malam Y, Seifalian A M. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications [J]. *Trends in Biotechnology*, 2010, **28**(11): 580-588.
- [4] Benn T M, Westerhoff P. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics [J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, **42**(11): 4133-4139.
- [5] Dobias J, Bernier-Latmani R. Silver release from silver nanoparticles in natural waters [J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, **47**(9): 4140-4146.
- [6] Whiteley C M, Valle M D, Jones K C, *et al.* Challenges in assessing release, exposure and fate of silver nanoparticles within the UK environment [J]. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 2013, **15**(11): 2050-2058.
- [7] Gottschalk F, Sonderer T, Scholz R W, *et al.* Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO_2 , ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions [J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, **43**(24): 9216-9222.

- [8] Chinnapongse S L, MacCuspie R I, Hackley V A. Persistence of singly dispersed silver nanoparticles in natural freshwaters, synthetic seawater, and simulated estuarine waters[J]. *Science of the Total Environment*, 2011, **409**(12): 2443-2450.
- [9] Fabrega J, Luoma S N, Tyler C R, *et al.* Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment [J]. *Environment International*, 2011, **37**(2): 517-531.
- [10] Park J W, Oh J H, Kim W K, *et al.* Toxicity of citrate-coated silver nanoparticles differs according to method of suspension preparation [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2014, **93**(1): 53-59.
- [11] Burchardt A D, Carvalho R N, Valente A, *et al.* Effects of silver nanoparticles in diatom *Thalassiosira pseudonana* and cyanobacterium *Synechococcus* sp. [J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, **46**(20): 11336-11344.
- [12] Tolaymat T M, Badawy A M E, Genaidy A, *et al.* An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications; a systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers [J]. *Science of the Total Environment*, 2010, **408** (5): 999-1006.
- [13] Pang C F, Brunelli A, Zhu C H, *et al.* Demonstrating approaches to chemically modify the surface of Ag nanoparticles in order to influence their cytotoxicity and biodistribution after single dose acute intravenous administration [J]. *Nanotoxicology*, 2015, doi: 10.3109/17435390.2015.1024295.
- [14] Levard C, Hotze E M, Lowry G V, *et al.* Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity [J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, **46** (13): 6900-6914.
- [15] 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.
- [16] Carlson C, Hussain S M, Schrand A M, *et al.* Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species [J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2008, **112**(43): 13608-13619.
- [17] Kim T H, Kim M, Park H S, *et al.* Size-dependent cellular toxicity of silver nanoparticles [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2012, **100**(4): 1033-1043.
- [18] Ivask A, Kurvet I, Kasemets K, *et al.* Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro [J]. *PLoS One*, 2014, **9** (7): e102108.
- [19] Matorin D N, Todorenko D A, Seifullina N K, *et al.* Effect of silver nanoparticles on the parameters of chlorophyll fluorescence and P₇₀₀ reaction in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Microbiology*, 2013, **82**(6): 809-814.
- [20] Liu L S, Zhou J, Zheng B H, *et al.* Temporal and spatial distribution of red tide outbreaks in the Yangtze River Estuary and adjacent waters, China [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2013, **72** (1): 213-221.
- [21] Wang Q, Zhu L S, Hu J P. A HAB mathematical model of competition between two algae species in the Yangtze River Estuary and its adjacent waters [A]. In: *Proceedings of 2010 International Conference on Multimedia Technology (ICMT)* [C]. Ningbo: IEEE, 2010. 1-4.
- [22] 杨世民, 王丽莎, 石晓勇. 2009 年夏季胶州湾同步调查浮游植物群落结构特征 [J]. *海洋与湖沼*, 2015, **46** (1): 102-108.
- [23] Kester D R, Duedall I W, Connors D N, *et al.* Preparation of artificial seawater [J]. *Limnology and Oceanography*, 1967, **12** (1): 176-179.
- [24] Guillard R R L, Ryther J H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (cleve) Gran [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1962, **8** (2): 229-239.
- [25] Jeffrey S T, Humphrey G F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton [J]. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen (BPP)*, 1975, **167**: 191-194.
- [26] Kim K T, Zaikova T, Hutchison J E, *et al.* Gold nanoparticles disrupt zebrafish eye development and pigmentation [J]. *Toxicological Sciences*, 2013, **133**(2): 275-288.
- [27] Bopp S K, Lettieri T. Gene regulation in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* upon exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) [J]. *Gene*, 2007, **396**(2): 293-302.
- [28] Kim Tiam S, Feurtet-Mazel A, Delmas F, *et al.* Development of q-PCR approaches to assess water quality: effects of cadmium on gene expression of the diatom *Eolimna minima* [J]. *Water Research*, 2012, **46**(4): 934-942.
- [29] 苑志华, 唐婷, 于昌平. 不同封端剂纳米银对氨氧化细菌的毒性研究 [A]. 见: 第六届全国环境化学学术大会暨环境科学仪器与分析仪器展览会摘要集 [C]. 北京: 中国化学会, 2011.
- [30] Li F M, Liang Z, Zheng X, *et al.* Toxicity of nano-TiO₂ on algae and the site of reactive oxygen species production [J]. *Aquatic Toxicology*, 2015, **158**: 1-13.
- [31] Navarro E, Wagner B, Odzak N, *et al.* Effects of differently coated silver nanoparticles on the photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, **49**(13): 8041-8047.
- [32] Leclerc S, Wilkinson K J. Bioaccumulation of nanosilver by *Chlamydomonas reinhardtii*-nanoparticle or the free ion? [J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, **48**(1): 358-364.
- [33] Oukarroum A, Barhoumi L, Pirastru L, *et al.* Silver nanoparticle toxicity effect on growth and cellular viability of the aquatic plant *Lemma gibba* [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2013, **32**(4): 902-907.
- [34] Oukarroum A, Bras S, Perreault F, *et al.* Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta* [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2012, **78**: 80-85.
- [35] Lu W T, Senapati D, Wang S G, *et al.* Effect of surface coating

- on the toxicity of silver nanomaterials on human skin keratinocytes [J]. *Chemical Physics Letters*, 2010, **487**(1-3): 92-96.
- [36] Angel B M, Batley G E, Jarolimek C V, *et al.* The impact of size on the fate and toxicity of nanoparticulate silver in aquatic systems[J]. *Chemosphere*, 2013, **93**(2): 359-365.
- [37] Ali N A, Dewez D, Didur O, *et al.* Inhibition of photosystem II photochemistry by Cr is caused by the alteration of both D₁ protein and oxygen evolving complex [J]. *Photosynthesis Research*, 2006, **89**(2-3): 81-87.
- [38] Domingues N, Matos A R, da Silva J M, *et al.* Response of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* to photooxidative stress resulting from high light exposure[J]. *PLoS One*, 2012, **7**(6): e38162.
- [39] 郭延平, 刘辉, 胡美君, 等. 植物 PS II 反应中心 D₁ 蛋白的结构与功能[A]. 见: 中国园艺学会第七届青年学术讨论会论文集[C]. 北京: 中国园艺学会, 2006.

《环境科学》征稿简则

1. 来稿报道成果要有创新性,论点明确,文字精炼,数据可靠.全文不超过8 000字(含图、表、中英文摘要及参考文献).国家自然科学基金项目、国家科技攻关项目、国际合作项目或其它项目请在来稿中注明(在首页以脚注表示).作者投稿时请先登陆我刊网站(www.hjcx.ac.cn)进行注册,注册完毕后以作者身份登录,按照页面给出的提示信息投稿即可.

2. 稿件请按 GB 7713-87《科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式》中学术论文的规范撰写.论文各部分的排列顺序为:题目;作者姓名;作者工作单位、地址、邮政编码;中文摘要;关键词;中图分类号;英文题目;作者姓名及单位的英译名;英文摘要;关键词;正文;致谢;参考文献.

3. 论文题目应简练并准确反映论文内容,一般不超过 20 字,少用副标题.

4. 中文摘要不少于 300 字,以第三人称写.摘要内容包括研究工作的目的、方法、结果(包括主要数据)和结论,重点是结果和结论.英文摘要与中文对应,注意人称、时态和语言习惯,以便准确表达内容.

5. 前言包括国内外前人相关工作(引文即可)和本工作的目的、特点和意义等.科普知识不必赘述.

6. 文中图表应力求精简,同一内容不得用图表重复表达,要有中英文对照题目.图应大小一致,曲线粗于图框,图中所有字母、文字字号大小要统一.表用三线表.图表中术语、符号、单位等应与正文一致.

7. 计量单位使用《中华人民共和国法定计量单位》(SI).论文中物理计量单位用字母符号表示,如 mg(毫克),m(米),h(小时)等.科技名词术语用国内通用写法,作者译的新名词术语,文中第一次出现时需注明原文.

8. 文中各级标题采用 1, 1.1, 1.1.1 的形式,左起顶格书写,3 级以下标题可用(1), (2)……表示,后缩 2 格书写.

9. 文中外文字母、符号应标明其大小写,正斜体.生物的拉丁学名为斜体.缩略语首次出现时应给出中文全称,括号内给出英文全称和缩略语.

10. 未公开发表资料不列入参考文献,可在出现页以脚注表示.文献按文中出现的先后次序编排.常见文献书写格式为:

期刊:作者(外文也要姓列名前).论文名[J].期刊名,年,卷(期):起页-止页.

图书:作者.书名[M].出版地:出版社,年.起页-止页.

会议文集:作者.论文名[A].见(In):编者.文集名[C].出版地:出版社(单位),年.起页-止页.

学位论文:作者.论文名[D].保存地:保存单位,年份.

报告:作者.论文名[R].出版地:出版单位,出版年.

专利:专利所有者.专利题名[P].专利国别:专利号,出版日期.

11. 来稿文责自负,切勿一稿多投.编辑对来稿可作文字上和编辑技术上的修改和删节.在 3 个月内未收到本刊选用通知,可来电询问.

12. 投稿请附作者单位详细地址,邮编,电话号码,电子邮箱等.编辑部邮政地址:北京市 2871 信箱;邮编:100085;电话:010-62941102,010-62849343;传真:010-62849343;E-mail:hjcx@cees.ac.cn;网址:www.hjcx.ac.cn

CONTENTS

Exploring the Severe Haze in Beijing During December, 2015; Pollution Process and Emissions Variation	XUE Yi-feng, ZHOU Zhen, NIE Teng, <i>et al.</i> (1593)
Pollution Characteristics and Source of HULIS in the Fine Particle During the Beijing APEC	ZHOU Xue-ming, QI Xue-jiao, XIANG Ping, <i>et al.</i> (1602)
Seasonal Variation Characteristics and Potential Source Contribution of Sulfate, Nitrate and Ammonium in Beijing by Using Single Particle Aerosol Mass Spectrometry	LIU Lang, ZHANG Wen-jie, DU Shi-yong, <i>et al.</i> (1609)
Pollution Characteristics and Source Apportionment of PM _{2.5} in Lanzhou City	WANG Xin, NIE Yan, CHEN Hong, <i>et al.</i> (1619)
Pollution Level and Source Apportionment of Atmospheric Particles PM _{2.5} in Southwest Suburb of Chengdu in Spring	LIN Yu, YE Zhi-xiang, YANG Huai-jin, <i>et al.</i> (1629)
Variation Characteristics of Total Gaseous Mercury at Simian Mountain Background Station in Mid-subtropical Region	LIU Wei-ming, MA Ming, WANG Ding-yong, <i>et al.</i> (1639)
Establishment of Method for Health Risk Assessment of Pollutants from Fixed Sources	CHEN Qiang, WU Huan-bo (1646)
Testing of Concentration and Characteristics of Particulate Matters Emitted from Stationary Combustion Sources in Beijing	HU Yue-qi, WU Xiao-dong, WANG Chen, <i>et al.</i> (1653)
Pollution Evaluation and Risk Assessment of Heavy Metals from Atmospheric Deposition in the Parks of Nanjing	WANG Cheng, QIAN Xin, LI Hui-ming, <i>et al.</i> (1662)
CoCuMnO ₂ Photocatalyzed Oxidation of Multi-component VOCs and Kinetic Analysis	MENG Hai-long, BO Long-li, LIU Jia-dong, <i>et al.</i> (1670)
Distribution of Nitrogen and Phosphorus in the Tidal Reach and Estuary of the Daliao River and Analysis of Potential Eutrophication	ZHANG Lei, CAO Wei, MA Ying-qun, <i>et al.</i> (1677)
Spatial Distribution of Stable Isotope from the Lakes in Typical Temperate Glacier Region	SHI Xiao-yi, PU Tao, HE Yuan-qing, <i>et al.</i> (1685)
$\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_3^-$ and $\delta^{18}\text{O}\text{-NO}_3^-$ Tracing of Nitrate Sources in Beijing Urban Rivers	ZHAO Qing-liang, MA Hui-ya, REN Yu-fen, <i>et al.</i> (1692)
Distribution Characteristics and Influencing Factors of Nitrate Pollution in Shallow Groundwater of Liujiang Basin	WANG He, GU Hong-biao, CHI Bao-ming, <i>et al.</i> (1699)
Nitrogen Losses Under the Action of Different Land Use Types of Small Catchment in Three Gorges Region	CHEN Cheng-long, GAO Ming, NI Jiu-pai, <i>et al.</i> (1707)
Interception Effect of Ecological Ditch on Nitrogen Transport in Agricultural Runoff in Subtropical China	WANG Di, LI Hong-fang, LIU Feng, <i>et al.</i> (1717)
Biodegradation Coefficients of Typical Pollutants in the Plain Rivers Network	FENG Shuai, LI Xu-yong, DENG Jian-cai (1724)
Influence of Submerged Plants on Microbial Community Structure in Sediment of Hongze Lake	ZHANG Ding-yu, ZHANG Ting-xi, DONG Dan-ping, <i>et al.</i> (1734)
Community Structure Characteristics of Diatom in Reservoirs Located in the South of Jiangsu Province, China and Its Control Factors	REN Jie, ZHOU Tao, ZHU Guang-wei, <i>et al.</i> (1742)
Contamination and Ecological Risk Assessment of Mercury in Hengshuihu Wetland, Hebei Province	WANG Nai-shan, ZHANG Man-yin, CUI Li-juan, <i>et al.</i> (1754)
Spatial Distribution and Potential Ecological Risk Assessment of Heavy Metals in Soils and Sediments in Shunde Waterway, Southern China	CAI Yi-min, CHEN Wei-ping, PENG Chi, <i>et al.</i> (1763)
Pollution Characteristics and Ecological Risk of PBDEs in Water and Sediment from an Electronic Waste Dismantling Area in Taizhou	CHEN Xiang-ping, PENG Bao-qi, LÜ Su-ping, <i>et al.</i> (1771)
Major Ionic Features and Their Controlling Factors in the Upper-Middle Reaches of Wujiang River	HUANG Qi-bo, QIN Xiao-qun, LIU Peng-yu, <i>et al.</i> (1779)
Export of Total Organic Carbon (TOC) from Karst Watershed and Its Influencing Factors; An Example from Xueyudong Underground River System, Chongqing	WANG Qiao-lian, JIANG Yong-jun, CHEN Yu (1788)
Seasonal Variations and Controlling Factors of the Element Contents in Drip Waters Collected from the Baojingong Cave in Guangdong Province	HUANG Jia-yi, CHEN Lin, CHEN Qiong, <i>et al.</i> (1798)
Tracing the Fecal Contamination Sources Based on <i>Bacteroides</i> 16S rRNA PCR-DGGE in Karst Groundwater; Taking Laolongdong Underground River System, Nanshan, Chongqing as an Example	ZHANG Hong, JIANG Yong-jun, ZHANG Yuan-zhu, <i>et al.</i> (1805)
Sources and Variation Characteristics of Dissolved Lipid Biomarkers in a Typical Karst Underground River	LIANG Zuo-bing, SUN Yu-chuan, LI Jian-hong, <i>et al.</i> (1814)
Formation of Halogenated By-products in Co ²⁺ Activated Peroxymonosulfate Oxidation Process	LIU Kuo, JIN Hao, DONG Wei, <i>et al.</i> (1823)
Aspartic Acid Generated in the Process of Chlorination Disinfection By-product Dichloroacetonitrile	DING Chun-sheng, LI Nai-jun, ZHANG Tao, <i>et al.</i> (1831)
Influencing Factors of Assimilable Organic Carbon (AOC) Formation in Drinking Water During Ozonation Process	DONG Bing-zhi, ZHANG Jia-li, HE Chang (1837)
Wastewater Quantity and Quality Fluctuation Characteristics of Typical Area of Hybrid Sewage System	CHENG Xun, ZHANG Ming-kai, LIU Yan-chen, <i>et al.</i> (1845)
Preparation of HDTMA-modified Zeolite and Its Performance in Nitro-phenol Adsorption from Wastewaters	GUO Jun-yuan, WANG Bin (1852)
Selection of Suitable Microalgal Species for Sorption of Uranium in Radioactive Wastewater Treatment	LI Xin, HU Hong-ying, YU Jun-yi, <i>et al.</i> (1858)
Magnetic Fe ₃ O ₄ Microparticles Conditioning-Pressure Electro-osmotic Dewatering (MPEOD) of Sewage Sludge	QIAN Xu, WANG Yi-li, ZHAO Li (1864)
Stability of Short-cut Nitrification Nitrogen Removal in Digested Piggery Wastewater with an Intermittently Aerated Sequencing Batch Reactor	SONG Xiao-yan, LIU Rui, SHUI Yong, <i>et al.</i> (1873)
Effect of Irrigation Patterns on Soil CO ₂ and N ₂ O Emissions from Winter Wheat Field in North China Plain	GUO Shu-fang, QI Yu-chun, YIN Fei-hu, <i>et al.</i> (1880)
Characteristics of Dissolved CH ₄ and N ₂ O Concentrations of Weihe River in Xinxiang Section in Spring	HOU Cui-cui, ZHANG Fang, LI Ying-chen, <i>et al.</i> (1891)
Effect of Stimulated N Deposition on N ₂ O Emission from a <i>Stipa krylovii</i> Steppe in Inner Mongolia, China	YANG Han-yue, ZHANG Ting, HUANG Yong-mei, <i>et al.</i> (1900)
Response of Soil Respiration and Organic Carbon to Returning of Different Agricultural Straws and Its Mechanism	CAO Zhan-bo, WANG Lei, LI Fan, <i>et al.</i> (1908)
Spatial Variability and Distribution Pattern of Soil Organic Matter in a Mollisol Watershed of China	GAO Feng-jie, MA Quan-lai, HAN Wen-wen, <i>et al.</i> (1915)
Effects of Tillage on Distribution of Heavy Metals and Organic Matter Within Purple Paddy Soil Aggregates	SHI Qiong-bin, ZHAO Xiu-lan, CHANG Tong-ju, <i>et al.</i> (1923)
Distribution Characteristics and Potential Ecological Hazards Assessment of Soil Heavy Metals in Typical Soil Profiles in Southeast Suburb of Beijing	ZHAO Qian, MA Lin, LIU Yi-fei, <i>et al.</i> (1931)
Contamination Assessment and Sources Analysis of Soil Heavy Metals in Opencast Mine of East Junggar Basin in Xinjiang	LIU Wei, YANG Jian-jun, WANG Jun, <i>et al.</i> (1938)
Effect of Nano-TiO ₂ on Release and Speciation Changes of Heavy Metals in Soil	ZHANG Jin-yang, WANG Ding-yong, LIANG Li, <i>et al.</i> (1946)
Reduction Kinetics of Cr(VI) in Chromium Contaminated Soil by Nanoscale Zerovalent Iron-copper Bimetallic	MA Shao-yun, ZHU Fang, SHANG Zhi-feng (1953)
Inhibition of Low Molecular Organic Acids on the Activity of <i>Acidithiobacillus</i> Species and Its Effect on the Removal of Heavy Metals from Contaminated Soil	SONG Yong-wei, WANG He-ru, CAO Yan-xiao, <i>et al.</i> (1960)
Contribution of Particle Size and Surface Coating of Silver Nanoparticles to Its Toxicity in Marine Diatom <i>Skeletonema costatum</i>	HUANG Jun, YI Jun, QIANG Li-yuan, <i>et al.</i> (1968)
Rhizospheric Mechanisms of <i>Hemerocallis middendorfii</i> Trautv. et Mey. Remediating Petroleum-contaminated Soil and Metabonomic Analyses of the Root Systems	WANG Ya-nan, CHENG Li-juan, ZHOU Qi-xing (1978)
Effects of Thermophilic Composting on Antibiotic Resistance Genes (ARGs) of Swine Manure Source	ZHENG Ning-guo, HUANG Nan, WANG Wei-wei, <i>et al.</i> (1986)
Interaction Between Sulfonamide Antibiotics Fates and Chicken Manure Composting	LIN Hui, WANG Jian-mei, SUN Wan-chun, <i>et al.</i> (1993)

《环境科学》第6届编辑委员会

主 编: 欧阳自远

副主编: 赵景柱 郝吉明 田 刚

编 委: (按姓氏笔画排序)

万国江 王华聪 王凯军 王绪绪 田 刚 田 静 史培军
朱永官 刘志培 刘 毅 汤鸿霄 孟 伟 周宗灿 林金明
欧阳自远 赵景柱 姜 林 郝郑平 郝吉明 聂永丰 黄 霞
黄 耀 鲍 强 潘 纲 潘 涛 魏复盛

环 境 科 学

(HUANJING KEXUE)

(月刊 1976年8月创刊)

2016年5月15日 第37卷 第5期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol. 37 No. 5 May 15, 2016

主 管	中国科学院	Superintended	by	Chinese Academy of Sciences
主 办	中国科学院生态环境研究中心	Sponsored	by	Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences
协 办	(以参加先后为序) 北京市环境保护科学研究院 清华大学环境学院	Co-Sponsored	by	Beijing Municipal Research Institute of Environmental Protection School of Environment, Tsinghua University
主 编	欧阳自远	Editor-in -Chief		OUYANG Zi-yuan
编 辑	《环境科学》编辑委员会 北京市2871信箱(海淀区双清路 18号, 邮政编码:100085) 电话:010-62941102, 010-62849343 传真:010-62849343 E-mail: hjkx@reces. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn	Edited	by	The Editorial Board of Environmental Science (HUANJING KEXUE) P. O. Box 2871, Beijing 100085, China Tel:010-62941102, 010-62849343; Fax:010-62849343 E-mail: hjkx@reces. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn
出 版	科 学 出 版 社 北京东黄城根北街16号 邮政编码:100717	Published	by	Science Press 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印 刷 装 订	北京北林印刷厂	Printed	by	Beijing Bei Lin Printing House
发 行	科 学 出 版 社 电话:010-64017032 E-mail: journal@mail. sciencep. com	Distributed	by	Science Press Tel:010-64017032 E-mail: journal@mail. sciencep. com
订 购 处	全国各地邮电局	Domestic		All Local Post Offices in China
国外总发行	中国国际图书贸易总公司 (北京399信箱)	Foreign		China International Book Trading Corporation (Guoji Shudian), P. O. Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号: ISSN 0250-3301
CN 11-1895/X

国内邮发代号: 2-821

国内定价: 120.00元

国外发行代号: M 205

国内外公开发行