

DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20211115001

高艺凡, 毛步云, 王艺, 等. 纳米氧化物对耐四环素尿肠球菌的毒性研究及机制初探[J]. 生态毒理学报, 2022, 17(4): 545-553

Gao Y F, Mao B Y, Wang Y, et al. A preliminary exploration for toxicity and mechanism of nano metal oxides to tetracycline resistant *Enterococcus faecium* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2022, 17(4): 545-553(in Chinese)

纳米氧化物对耐四环素尿肠球菌的毒性研究及机制初探

高艺凡¹, 毛步云², 王艺¹, 程远¹, 袁青彬^{1,*}

1. 南京工业大学环境科学与工程学院, 南京 211816

2. 南京水务集团有限公司, 南京 210000

收稿日期: 2021-11-15 录用日期: 2022-01-20

摘要: 城镇污水处理厂是废弃纳米材料在环境中重要的收纳场所, 在水处理过程中存在与另一类新污染物耐药细菌及其抗性基因充分接触并相互作用的机会。尽管纳米材料对包括细菌在内的各种生物的毒性效应被普遍报道, 然而对耐药细菌的毒性及风险的影响鲜有研究。本研究考察了3种污水中广泛存在的纳米氧化物对耐四环素尿肠球菌的毒性, 并探索了纳米氧化物种类、粒径、浓度和在水中的赋存时间等因素的影响。结果表明, 3种纳米氧化物的毒性大小为 $n\text{CuO} > n\text{ZnO} > n\text{TiO}_2$; 纳米氧化物对耐四环素尿肠球菌的毒性随浓度和粒径的提高均呈现先升高后降低的趋势, 如在 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 40 nm 处 $n\text{TiO}_2$ 毒性达到最高; 赋存时间越长, 纳米氧化物对耐四环素尿肠球菌的毒性越强。从影响机理看, 纳米氧化物刺激显著提升了细胞膜的通透性, 破坏细胞膜, 导致细胞破裂死亡。本文为阐明污水中广泛共存的纳米材料对耐药细菌的影响提供支撑。

关键词: 纳米氧化物; 耐四环素尿肠球菌; 毒性; 通透性

文章编号: 1673-5897(2022)4-545-09 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

A Preliminary Exploration for Toxicity and Mechanism of Nano Metal Oxides to Tetracycline Resistant *Enterococcus faecium*

Gao Yifan¹, Mao Buyun², Wang Yi¹, Cheng Yuan¹, Yuan Qingbin^{1,*}

1. College of Environmental Science and Technology, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China

2. Nanjing Tap Water General Company, Nanjing 210000, China

Received 15 November 2021 accepted 20 January 2022

Abstract: Urban wastewater treatment plants are important reservoirs of waste nanomaterials in the environment. Nano metal oxides (NMOs) can contact and interact extensively with another emerging contaminants, antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARGs) during wastewater treatment process. Despite of frequent reports on the toxicity of nanomaterials to a variety of organisms including bacteria, few studies have been conducted yet on the toxicity of nanomaterials on ARB. In this study, the toxicity of NMOs to tetracycline-resistant *Enterococcus faecium* (TRE) was examined, and influences of NMOs' type, size, concentration and persistent period on the toxicity were explored. Results showed that the toxicity of NMOs followed the order of $n\text{CuO} > n\text{ZnO} >$

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(42177348); 江苏省自然科学基金资助项目(BK20201367)

第一作者: 高艺凡(2002—), 女, 本科生, 研究方向为环境中抗性基因的行为与控制技术, E-mail: 2924733761@qq.com

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

nTiO₂. The toxicity of NMOs on TRE increased with NMOs' concentration and size, reaching the highest at 50 mg·L⁻¹ and 40 nm (nTiO₂), and then decreased finally. Furthermore, the toxicity of NMOs increased with the persistent period. As for the mechanism, NMOs substantially increased the permeability of TRE, destroyed cell membranes, and induced the rupture and death of cells. This study can be helpful in elucidating the effect of widely co-existing nano metal oxides in wastewater on antibiotic resistant bacteria.

Keywords: nano metal oxides; *Enterococcus faecium*; toxicity; cell permeability

纳米材料的大量生产、使用和排放使其在环境中大量存在,已经成为不可忽视的一类环境污染物质^[1]。各种环境中已经检出了各类纳米材料残留^[2-3],其中城市污水厂是重要的储存库之一,据报道污水中纳米材料的检出浓度可达 μg·L⁻¹至 mg·L⁻¹^[4-7]。如 Tan 等^[8]报道污水中 ZnO 浓度的可达 mg·L⁻¹水平。环境中纳米材料具有显著的生态环境效应,如使机体产生氧化应激和炎症反应,从而造成机体损伤甚至死亡^[9-11]。对于细菌,纳米材料如纳米氧化物等可以触发氧化应激反应使细菌破裂而引发凋亡^[12-13]。纳米材料对细菌的毒性一般既有本身纳米级尺寸具有的毒性效应,也有纳米材料溶解成为离子引发的毒性^[14-17]。由于城市污水同样是一类近年来普遍关注的新污染物耐药细菌的重要储存库^[18-21],纳米材料和耐药细菌有广泛共存,存在大量相互接触和作用的机会,因此纳米材料势必也会对耐药细菌造成影响,从而导致细菌耐药性风险的变化,但目前对于纳米材料对耐药细菌影响的相关研究仍非常有限。

笔者课题组在前期研究中以耐药性大肠杆菌为例初步考察了纳米氧化物对耐药革兰氏阴性细菌的影响,发现纳米氧化物造成了耐药细菌的部分死亡以及耐药水平等方面的变化^[22],为纳米材料影响耐药细菌的研究提供了参考。本研究从污水中分离出耐四环素性屎肠球菌,以此为例考察了3种污水中广泛存在的纳米氧化物纳米氧化钛(nTiO₂)、纳米氧化锌(nZnO)和纳米氧化铜(nCuO)^[18]对革兰氏阳性细菌的毒性。屎肠球菌是一种重要的人畜共患条件性致病菌,美国已将其列为引起临床感染的第二大病原菌^[23-24],屎肠球菌在城市污水、医院废水等环境中也被广泛检出^[25]。本文研究了不同种类、粒径、浓度和在水中的赋存时间的3种纳米氧化物对耐四环素性屎肠球菌的存活率的影响。在此基础上初步考察了纳米氧化物对耐药性屎肠球菌的细胞膜影响,探索了影响机制。本研究将为阐明纳米材料对各类耐药细菌的影响及机制提供支撑。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 纳米材料及细菌

本实验使用的纳米氧化物为由上海盈承新材料有限公司购得的 nZnO (30、50、90 和 200 nm)、nCuO (40 nm)和 nTiO₂(5 ~ 10、25、40 和 100 nm),3种纯度达 99.9% 的商品纳米氧化物材料。为避免可能存在的添加剂对实验的影响,纳米氧化物在使用前于水中超声分散 10 min 后于去离子水中浸泡 12 h 过夜,离心回收后备用。使用前,将纳米氧化物加入到经 0.45 μm 和 0.22 μm 2 种尺寸滤膜过滤的二沉池出水,配制浓度不同的纳米颗粒悬浮液,并将其超声混匀后静置备用。另外,分别测定纳米氧化物的水合粒径和溶解的金属离子浓度。将不同浓度和粒径的纳米氧化物配制成为悬浮液,使用纳米粒度电位仪(Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, UK)对 nZnO 的水合粒径进行检测。将样品离心,弃去上清液后用稀硝酸消解后,使用 ICP-OES(Avio 550, Perkinelmer, USA)测定溶解的离子浓度。

耐四环素屎肠球菌分离自于南京市某城镇污水厂活性污泥,将采集的新鲜活性污泥梯度稀释后涂板至含有四环素(36 mg·L⁻¹)的粪肠球菌琼脂选择性培养基(HB0268-2,海博生物,中国),根据菌落特征初步筛选若干粪肠球菌菌落,纯化培养后送至南京金思瑞生物科技有限公司测序鉴定细菌种类为屎肠球菌 *Enterococcus faecium* 7039809-1(MH385356.1)。而后通过使用 PCR 检测确认此菌种带有四环素类抗性基因 *tetM* 和 *tetL*。

1.2 纳米氧化物对耐四环素屎肠球菌毒性的毒性测定

在避光条件下,将活化后的耐四环素屎肠球菌离心后重悬至经 0.45 μm 和 0.22 μm 2 种尺寸滤膜过滤的二沉池出水(经平板计数确认细菌被完全去除),加入一定量的纳米氧化物悬浮液后在恒温振荡培养箱中振荡反应 30 min。取 1 mL 反应后的细菌悬浊液梯度加入含有四环素(36 mg·L⁻¹)的 LB 培养基中培养,每个培养皿加入细菌量为 10 mL 左右,

待冷却凝固后放入恒温培养箱中 37 °C 培养 96 h, 记录各培养基中菌落数(N_1), 同时将没有加入纳米氧化物的细菌溶液同样参照上述步骤培养, 记录培养基中菌落数(N_0), 计算耐四环素尿肠球菌的存活率(式(1))。

$$\text{存活率} = N_1 / N_0 \times 100\% \quad (1)$$

为考察纳米氧化物种类以及粒径对毒性的影响, 分别考察 nZnO、nCuO 和 nTiO₂ 3 种纳米氧化物在 10 mg·L⁻¹ 和 100 mg·L⁻¹ 和不同粒径下的耐四环素尿肠球菌的存活率; 为考察纳米氧化物浓度对毒性的影响, 以 nZnO 和 nTiO₂ 为例考察 0、10、20、50 和 100 mg·L⁻¹ 的 2 种纳米氧化物反应后耐四环素尿肠球菌的存活率; 为考察纳米氧化物赋存形态对毒性的影响, 将纳米氧化物悬浮液静置 0、3 和 6 h 后进行毒性测定, 考察耐四环素尿肠球菌存活率。

1.3 纳米氧化物对耐四环素尿肠球菌细胞膜的影响

使用乳酸脱氢酶释放法考察纳米氧化物对耐四环素尿肠球菌细胞膜的影响。其原理是细胞凋亡或坏死而造成的细胞膜结构的破坏会导致细胞浆内的酶释放到培养液里, 其中包括酶活性较为稳定的乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)。通过检测从质膜破裂的细胞中释放到培养液中的 LDH 的活性, 就可以实现对细胞毒性的定量分析^[26]。采用试剂盒(Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST, 东仁化学科技(上海)有限公司, 中国)进行测定, 将接触纳米氧化物的耐四环素尿肠球菌离心后置于 96 孔板中作为实验组, 按照说明书提示的溶液量加入对应的样品制成对照组和背景组, 依次加入反应试剂充分反应后立

即用酶标仪测定各孔在 490 nm 的吸光度。而后通过计算得出本实验中的 LDH 活性计算式(式(2)), 并采用计算出的 LDH 活性单位为标准, 表示细胞的氧化应激作用。

LDH 活性单位计算式:

$$\text{LDH}(\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}) = \Delta A \div 0.725 \div T \times 10^3 = 92 \times \Delta A \quad (2)$$

式中: ΔA 为测定吸光度与对照吸光度之差, T 为每微摩尔标准品稀释所用溶液的体积(L)。

1.4 数据分析

采用 $P=0.05$ 水平考察不同处理之间的显著性差异, 当 $P<0.05$ 时认为数据之间存在显著不同。采用 Pearson 相关性分析考察 2 组数据间的相关性。上述数据处理过程均在 Origin 9.0 软件中进行。

2 结果 (Results)

2.1 纳米氧化物种类对耐四环素尿肠球菌毒性的影响

首先考察了 3 种常见的纳米氧化物对耐四环素尿肠球菌存活率的影响(图 1)。可以发现, 在暴露浓度为 10 mg·L⁻¹ 和 100 mg·L⁻¹ 时 3 种纳米氧化物的毒性顺序一致, 即 nCuO>nZnO>nTiO₂ ($P<0.05$)。在 3 种纳米氧化物中 nCuO 的毒性最强, 10 mg·L⁻¹ 即造成 37.03% 的细菌死亡。相比之下, nTiO₂ 毒性相对较低, 在 100 mg·L⁻¹ 时的致死率仅为 nZnO 的 63.72%。

2.2 浓度和粒径对纳米氧化物对于耐四环素尿肠球菌毒性的影响

以 nTiO₂ 和 nZnO 为例考察了浓度和粒径对纳米氧化物对于耐四环素尿肠球菌毒性的影响(图 2)。

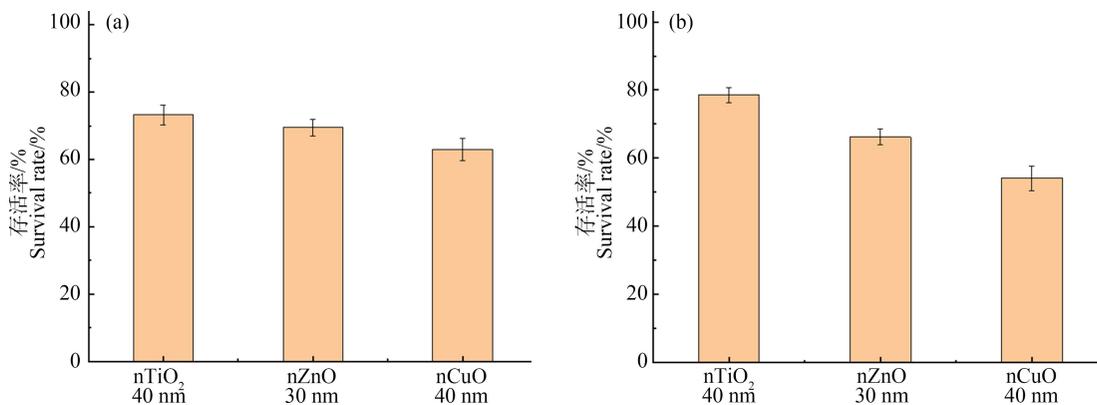


图 1 不同种类纳米氧化物对耐四环素尿肠球菌存活率的影响

注: (a) 纳米氧化物的浓度为 10 mg·L⁻¹; (b) 纳米氧化物的浓度为 100 mg·L⁻¹。

Fig. 1 The effect of different kinds of nano metal oxides on the survival rate of tetracycline resistant *Enterococcus faecium*

Note: (a) Nano-oxides at the concentration of 10 mg·L⁻¹; (b) Nano-oxides at the concentration of 100 mg·L⁻¹.

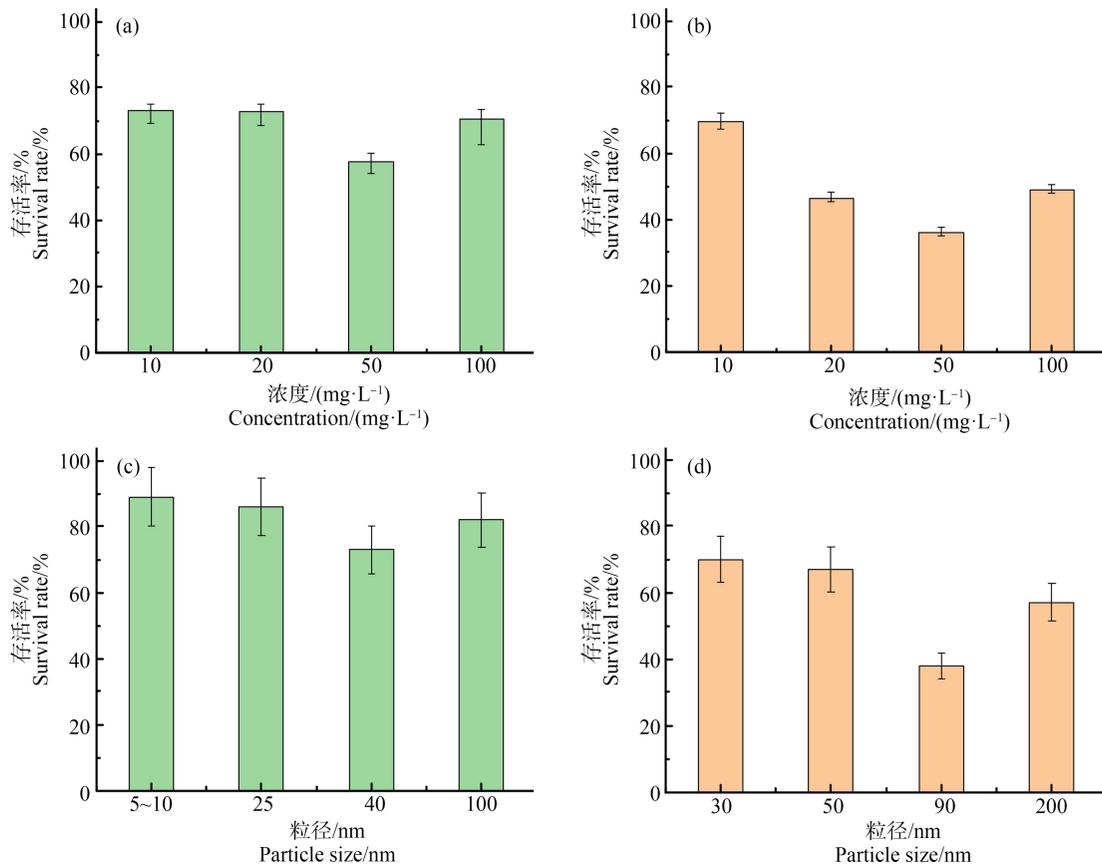


图2 不同纳米氧化物浓度和粒径对耐四环素屎肠球菌存活率的影响

注:(a)不同浓度的 nTiO₂; (b)不同浓度的 nZnO; (c)不同粒径的 nTiO₂; (d)不同粒径的 nZnO。

Fig. 2 The influence of different nano metal oxide concentration and size on the survival rate of tetracycline resistant *Enterococcus faecium*

Note: (a) Different concentrations of nTiO₂; (b) Different concentrations of nZnO; (c) Different size of nTiO₂; (d) Different size of nZnO.

由(图2(a))可知,10 mg·L⁻¹相同粒径和形态的 nTiO₂ 胁迫下,细菌存活率约为 73.38%;当浓度从 10 mg·L⁻¹提高时,存活率呈降低趋势,至 50 mg·L⁻¹时存活率仅为 58.67%,表明毒性随浓度提高而增强,但当浓度由 50 mg·L⁻¹提升至 100 mg·L⁻¹时,存活率并未出现继续下降,反而有所升高,此时存活率为 70.60%。nZnO 的毒性随浓度变化的趋势与 nTiO₂ 类似,即存活率先降低到 50 mg·L⁻¹时的最低值(36.00%),继而升高至 48.85%。

从粒径对纳米氧化物的毒性影响来看,粒径变大时,存活率呈降低趋势,表明毒性不断加大,如粒径 90 nm 的 ZnO 较粒径 30 nm 使耐四环素屎肠球菌的存活率降低了 32%,粒径 40 nm 的 nTiO₂ 的较粒径 5~10 nm 的 nTiO₂ 作用下,耐药细菌的存活率降低了 16%。然而纳米氧化物的毒性并不随粒径的增大持续增大,当 nZnO 的粒径由 90 nm 提高到 200 nm 时毒性发生明显降低,细菌存活率提高

了 19%;nTiO₂ 在 100 nm 时的毒性比 40 nm 上升了 9%。

2.3 赋存时间对纳米氧化物对于耐四环素屎肠球菌毒性的影响

实验设置的 3 个赋存时间 0、3 和 6 h,可认为反映了纳米材料排放至水中的不同状态,如赋存 0 h 为纳米氧化物刚进入污水中,赋存 3 h 为含纳米氧化物的污水经排水管网进入污水厂的途中,赋存 6 h 为在污水处理厂处理的阶段。以 nTiO₂ 和 nZnO 为例,考察上述 3 种赋存时间对纳米氧化物毒性的影响(图3)。nZnO 悬浮液赋存时间为 0 h 时细菌细胞存活率为 48.85%,历经 6 h 后细菌存活率下降了 22.15%。同样地,100 mg·L⁻¹ nTiO₂ 悬浮液赋存时间为 0 h 时细菌细胞存活率为 70.60%,历经 6 h 后细菌细胞存活率下降了 8.34%,即随着赋存时间的延长,细菌的存活率呈降低趋势($P < 0.05$),表明纳米氧化物的毒性不断增大。

2.4 耐药细菌的通透性受纳米氧化物的影响规律

通过测定 LDH 活性值来反映细胞通透性,从而考察不同种类、粒径、浓度和赋存时间对纳米氧化物毒性的影响机制(图 4)。从种类的影响来看,对细胞通透性影响的大小顺序为 nZnO、nCuO 和 nTiO₂,该顺序与前述纳米氧化物的毒性顺序存在差异,主要是 nZnO 取代 nCuO 成为使通透性提高最多的种类。从浓度的影响看,通透性随着浓度的提高不断提高,如 nCuO 浓度从 10 mg·L⁻¹ 依次增加到 100 mg·L⁻¹ 时,LDH 的值提高了 1.809 U·mL⁻¹,当 nAl₂O₃ 浓度从 10 mg·L⁻¹ 依次增加到 100 mg·L⁻¹ 时,LDH 的值提高了 0.708 U·mL⁻¹。从粒径的影响

看,通透性随着纳米氧化物粒径的提高而不断提高。如 nTiO₂ 粒径从 5 nm 依次增加到 100 nm,LDH 提高了 0.269 U·mL⁻¹。当 nZnO 粒径从 30 nm 增加到 200 nm 时,LDH 提高了 0.892 U·mL⁻¹。从赋存时间的影响看,赋存时间的延长使通透性不断提高。如 nCuO(10 mg·L⁻¹)悬浮液赋存时间从 0 h 到 6 h,LDH 提高了 0.613 U·mL⁻¹,而在 100 mg·L⁻¹ 的条件下提高了 0.474 U·mL⁻¹。进一步分析了细胞的存活率和通透性之间相关性(表 1),发现在浓度和赋存时间影响因素的实验中两者显著相关($P < 0.05$),且相关性较强;而粒径和种类的影响因素试验下两者虽然同样显著相关($P < 0.05$),但相关性较弱。

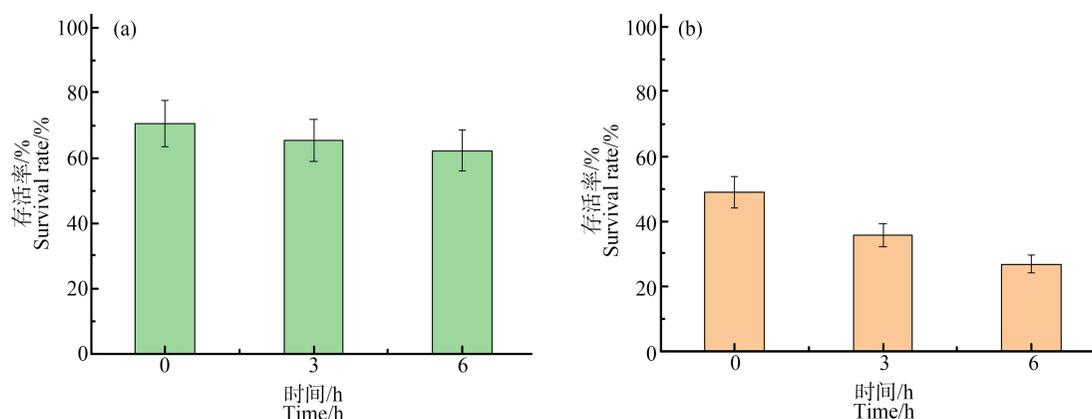


图3 不同赋存时间对耐四环素尿肠球菌存活率的影响

注:(a) 100 mg·L⁻¹ nTiO₂, (b) 100 mg·L⁻¹ nZnO。

Fig. 3 Effects of different persistent period on the survival rate of tetracycline resistant *Enterococcus faecium*

Note: (a) 100 mg·L⁻¹ nTiO₂, (b) 100 mg·L⁻¹ nZnO.

表1 细胞的存活率和 LDH 的产量之间相关性分析

Table 1 Correlation analysis between cell survival rate and LDH production

线性拟合项目 Linear fitting parameter	相关系数(r^2) Correlation coefficient (r^2)	P 值 P value
不同种类纳米氧化物处理后尿肠球菌产生的 LDH 值 LDH value produced by <i>Enterococcus faecium</i> after treatment with different kinds of nano-oxides	0.85 (10 mg·L ⁻¹)	0.18
	0.66 (100 mg·L ⁻¹)	0.27
不同浓度纳米氧化物处理后尿肠球菌产生的 LDH 值 LDH value produced by <i>Enterococcus faecium</i> after treatment with different concentrations of nano-oxides	0.93 (nCuO)	0.036
	0.87 (nAl ₂ O ₃)	0.068
不同粒径纳米氧化物处理后尿肠球菌产生的 LDH 值 LDH value produced by <i>Enterococcus faecium</i> after treatment with different size of nano-oxides	0.97 (nTiO ₂)	0.01
	0.36 (nZnO)	0.24
不同赋存时间 nCuO 处理后尿肠球菌产生的 LDH 值 LDH value produced by <i>Enterococcus faecium</i> after treatment with different storage time of nano-oxides nCuO	0.92 (10 mg·L ⁻¹)	0.13
	0.54 (100 mg·L ⁻¹)	0.32

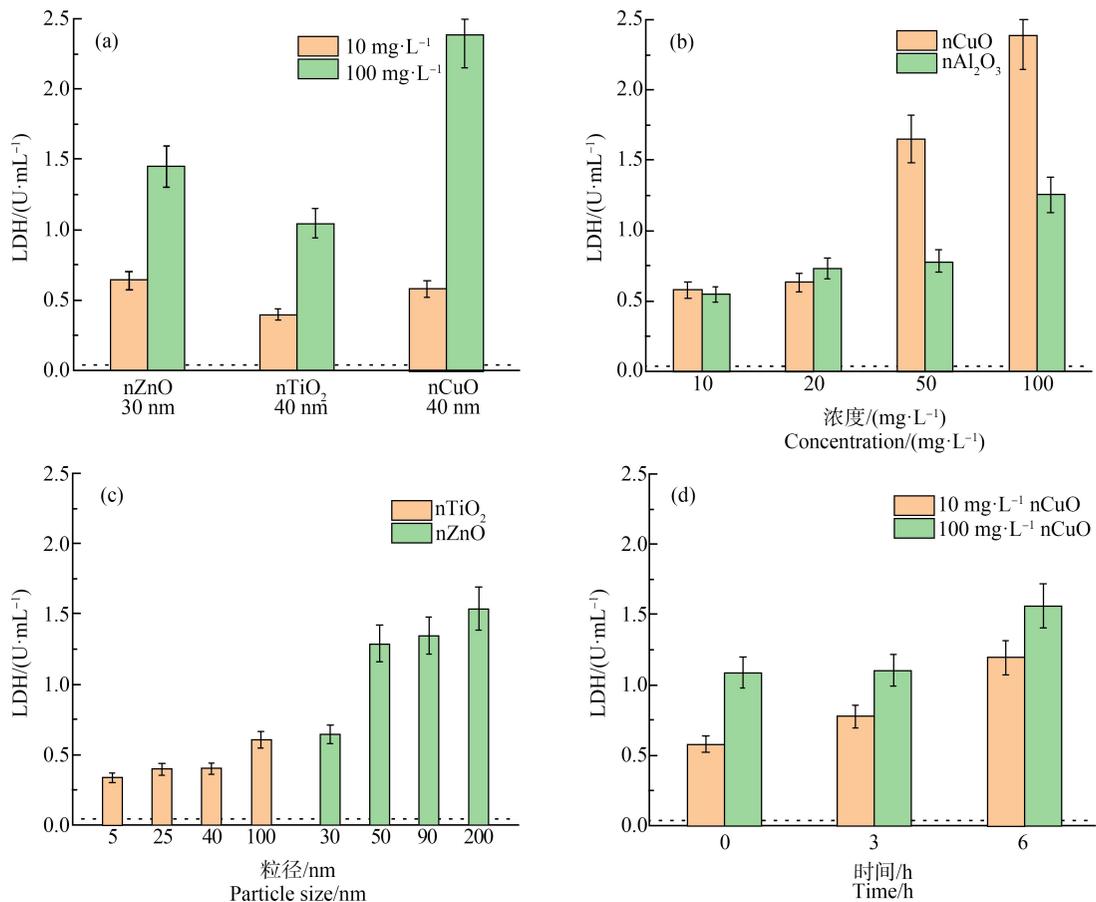


图4 不同种类、浓度、粒径的纳米氧化物及不同赋存时间下与耐四环素屎肠球菌反应后的LDH值

注:(a)不同种类,(b)不同浓度,(c)不同粒径,(d)不同赋存时间;LDH为测定出的乳糖脱氢酶活性值,虚线表示未经纳米氧化物处理的耐四环素屎肠球菌的LDH值。

Fig. 4 The LDH value of tetracycline resistant *Enterococcus faecium* after reacting with nano metal oxides of different types, concentrations, sizes and different storage times

Note: (a) Different kinds, (b) Different concentrations, (c) Different size, (d) Different storage time; LDH indicates the measured lactate dehydrogenase activity value, and the dotted line represents the LDH value of tetracycline-resistant *Enterococcus faecium* without nano metal oxide treatment.

3 讨论 (Discussion)

在nZnO、nCuO和nTiO₂3种纳米材料中,nCuO的毒性最强,可能是因为nCuO溶解出的Cu²⁺具有较强的毒性,能够进入细胞导致细胞死亡^[27]。在一项针对nZnO、nCuO和nTiO₂对酵母菌的毒性研究中,同样发现nCuO毒性最强^[28]。相近地,nZnO对耐四环素屎肠球菌也表现出较强毒性,在10 mg·L⁻¹暴露时致死率达30.56%,可能是由于nZnO溶解产生的Zn²⁺具有细胞毒性导致,在本研究中nZnO在加入浓度为10 mg·L⁻¹时溶解的Zn²⁺浓度达1.03 mg·L⁻¹。Zn²⁺被报道可以破坏细胞膜使细胞内容物流出,同时抑制细胞壁的合成,抑制细胞的繁殖和生长,进而使细胞死亡^[29]。相比之下,nTiO₂的毒性相对较低可能是因为nTiO₂溶解性较低,溶

出的离子浓度较低。而且相应的离子的毒性低于Cu²⁺和Zn²⁺,所以表现出较低的毒性。如徐争启等^[30]在研究中报道Ti的毒性系数远小于Cu。此外,nTiO₂较弱的毒性可能与其带电性有关。据报道nTiO₂表面的电荷值接近中性,不易与表面带负电的耐药细菌结合,因此毒性较低^[31]。

在探究浓度对纳米氧化物对耐四环素屎肠球菌毒性的研究中发现,纳米氧化物浓度较低时,毒性随纳米氧化物浓度的升高而加强($P < 0.05$),这可能除离子溶解外,纳米氧化物本身的毒性也是导致细菌死亡的因素。加入的纳米氧化物浓度升高后与细菌的接触概率提高,以及析出的离子浓度提高。然而,浓度进一步提高后尽管析出的离子浓度可能有进一步提高(如nZnO在浓度为10 mg·L⁻¹时Zn²⁺析出浓度

为 $1.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 在浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 Zn^{2+} 析出浓度为 $12.16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 但是过高浓度的纳米氧化物容易发生团聚, 形成的实际粒径远大于低浓度时(如 ZnO 在浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时水合粒径为 401.80 nm , 在浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时水合粒径为 917.38 nm), 因此导致纳米氧化物的接触毒性变弱, 使纳米氧化物的总体毒性下降。这表明纳米氧化物的粒径对毒性的影响可能是粒子的接触和溶出为金属离子共同作用的结果。

关于粒径对纳米颗粒毒性的影响研究尽管已开展较多, 但是没有定论。很多研究认为粒径越小, 纳米颗粒的毒性越大^[32], 主要是由于粒径越小分散性越好, 容易与微生物接触。此外, 粒径越小可能有利于金属离子的溶解, 因而毒性增大^[33-34]。然而, 也有研究发现纳米颗粒粒径越大, 毒性越大, 主要是由于粒径越小在水中越容易团聚, 导致毒性降低^[35]。本研究发现纳米氧化物毒性随粒径增大先增大后减小的趋势, 可能再次验证了纳米颗粒的接触和溶解金属离子同时起作用, 即在较小粒径范围时, 容易溶解产生离子, 但是纳米颗粒易团聚(如粒径为 30 nm 的 nZnO 水合粒径为 401.80 nm , 团聚倍数为 13.39), 综合表现为粒径越小毒性越小, 当粒径范围提高后, 纳米颗粒团聚趋势减弱(如粒径为 200 nm 的 nZnO 水合粒径为 857.49 nm , 团聚倍数为 4.29), 因此毒性增加^[36-37]。而粒径进一步增加后, 离子溶解减少, 纳米颗粒的接触毒性也降低, 因此毒性降低。

对于赋存时间对毒性的影响研究发现随着赋存时间的延长, 细菌的存活率降低, 这可能是因为赋存时间的延长使纳米氧化物溶出的金属离子浓度提高(如浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 nZnO 在 0 h 的溶解金属离子总浓度为 $1.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 在 6 h 的总浓度为 $1.62 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 因此毒性增强。相近的结果在前人的研究中也报道, 如 Ma 等^[38]研究了纳米氧化锌对大肠杆菌的暴露时间和抗菌率的关系, 发现暴露时间越长, 纳米氧化锌的抗菌效率越高, 因为暴露时间越长溶出的金属离子的浓度在不断提高。

细胞通透性的提高与纳米氧化物的毒性之间的变化趋势尽管存在相似之处, 但也有不少情况下偏差较大。这可能是因为同一种纳米氧化物经不同的处理后, 其毒性与细胞通透性间存在较好的相关性, 说明纳米氧化物作用于细胞先破坏细胞膜使其通透性增大, 然后金属离子或纳米氧化物颗粒进入细胞体内使其死亡; 而不同种类或粒径的纳米氧化物之

间差距较大, 造成的通透性变化差异较大。

研究表明, 纳米氧化物在污水处理过程中对耐四环素尿肠球菌表现出较明显的毒性, 且毒性受纳米氧化物种类、粒径、浓度和在水中的赋存时间等影响。3种纳米氧化物的毒性大小为 $\text{nCuO} > \text{nZnO} > \text{nTiO}_2$; 纳米氧化物毒性随浓度和粒径的提高均呈现先升高后降低的趋势; 赋存时间越长, 纳米氧化物对耐四环素尿肠球菌的毒性越强。从影响机理看, 纳米氧化物及其溶解产生的金属离子共同作用, 破坏细胞膜, 提升了细胞膜的通透性, 纳米氧化物和金属离子进入细胞进一步破坏胞内物质, 导致细胞死亡。然而, 纳米氧化物对耐四环素尿肠球菌的毒性并不必然意味着抗生素抗性风险的降低, 抗性基因可能在胞外仍保留活性。尽管纳米氧化物与耐药细菌存在广泛的接触和相互作用的机会, 纳米氧化物对耐药细菌的影响在以往的研究中尚未被充分揭示, 在未来的研究中需要继续关注。本研究可为阐明纳米材料对耐药细菌的影响作用和机制提供理论和实验支撑。

通讯作者简介: 袁青彬(1987—), 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为环境中抗性基因的行为与控制技术。

参考文献 (References):

- [1] Ren M J, Horn H, Frimmel F H. Aggregation behavior of TiO_2 nanoparticles in municipal effluent: Influence of ionic strength and organic compounds [J]. *Water Research*, 2017, 123: 678-686
- [2] Sun T Y, Conroy G, Donner E, et al. Probabilistic modeling of engineered nanomaterial emissions to the environment: A spatio-temporal approach [J]. *Environmental Science: Nano*, 2015, 2(4): 340-351
- [3] 代朝猛, 沈晖, 段艳平, 等. 土壤和地下水环境中纳米材料迁移的研究进展[J]. *水资源与水工程学报*, 2018, 29(3): 236-242, 248
Dai C M, Shen H, Duan Y P, et al. Review on the transportation of nanomaterials in soil and groundwater environment [J]. *Journal of Water Resources and Water Engineering*, 2018, 29(3): 236-242, 248 (in Chinese)
- [4] 苗令占, 王沛芳, 侯俊, 等. 金属纳米材料对不同微生物聚集体的毒性研究进展[J]. *水资源保护*, 2019, 35(1): 73-78, 94
Miao L Z, Wang P F, Hou J, et al. Research progress on toxicity of metallic nanomaterials to different microbial aggregates [J]. *Water Resources Protection*, 2019, 35(1): 73-78, 94 (in Chinese)
- [5] Kapoor V, Phan D, Pasha A B M T. Effects of metal ox-

- ide nanoparticles on nitrification in wastewater treatment systems: A systematic review [J]. *Journal of Environmental Science and Health Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 2018, 53(7): 659-668
- [6] Kunhikrishnan A, Shon H K, Bolan N S, et al. Sources, distribution, environmental fate, and ecological effects of nanomaterials in wastewater streams [J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2015, 45(4): 277-318
- [7] Liu G Q, Wang D M, Wang J M, et al. Effect of ZnO particles on activated sludge: Role of particle dissolution [J]. *Science of the Total Environment*, 2011, 409(14): 2852-2857
- [8] Tan M, Qiu G L, Ting Y P. Effects of ZnO nanoparticles on wastewater treatment and their removal behavior in a membrane bioreactor [J]. *Bioresource Technology*, 2015, 185: 125-133
- [9] 蔡全领, 胡献刚, 周启星. 石墨烯纳米材料对哺乳动物的毒性及其作用机制[J]. *生态毒理学报*, 2017, 12(6): 1-10
Cai Q L, Hu X G, Zhou Q X. Toxicity mechanism of graphene nanomaterials to mammals [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2017, 12(6): 1-10 (in Chinese)
- [10] 丛艺, 穆景利, 王菊英. 纳米材料在水环境中的行为及其对水生生物的毒性效应[J]. *海洋湖沼通报*, 2014(3): 112-120
Cong Y, Mu J L, Wang J Y. Behavior and toxicity of nanomaterials in aquatic environment [J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2014(3): 112-120 (in Chinese)
- [11] Ahmad F, Liu X Y, Zhou Y, et al. An *in vivo* evaluation of acute toxicity of cobalt ferrite (CoFe₂O₄) nanoparticles in larval-embryo zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2015, 166: 21-28
- [12] Djurišić A B, Leung Y H, Ng A M C, et al. Toxicity of metal oxide nanoparticles: Mechanisms, characterization, and avoiding experimental artefacts [J]. *Small*, 2015, 11(1): 26-44
- [13] 陈斌, 张传玲, 江红生, 等. 纳米银诱导拟南芥活性氧自由基的积累和抗氧化系统的改变[J]. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(4): 1646-1653
Chen B, Zhang C L, Jiang H S, et al. Silver nanoparticles induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2017, 36(4): 1646-1653 (in Chinese)
- [14] 韩泽洲, 苏锐, 史楠, 等. 金属和非金属纳米材料对四膜虫生物毒性研究[J]. *生态毒理学报*, 2019, 14(2): 91-97
Han Z Z, Su R, Shi N, et al. Biototoxicity of metal and non-metal nanomaterials to tetrahymena [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2019, 14(2): 91-97 (in Chinese)
- [15] 范功端, 陈薇, 郑小梅, 等. 纳米材料对藻细胞毒性效应及致毒机理[J]. *生态毒理学报*, 2018, 13(2): 23-33
Fan G D, Chen W, Zheng X M, et al. The cytotoxic effects of nanomaterials on algae and its mechanisms [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2018, 13(2): 23-33 (in Chinese)
- [16] Bai W, Zhang Z Y, Tian W J, et al. Toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryo: A physicochemical study of toxicity mechanism [J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 2010, 12(5): 1645-1654
- [17] Joško I, Oleszczuk P. Manufactured nanomaterials: The connection between environmental fate and toxicity [J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2013, 43(23): 2581-2616
- [18] Wang S T, Liu Z S, Wang W Q, et al. Fate and transformation of nanoparticles (NPs) in municipal wastewater treatment systems and effects of NPs on the biological treatment of wastewater: A review [J]. *RSC Advances*, 2017, 7(59): 37065-37075
- [19] 李超, 鲁建江, 童延斌, 等. 喹诺酮抗性基因在城市污水处理系统中的分布及去除[J]. *环境工程学报*, 2016, 10(3): 1177-1183
Li C, Lu J J, Tong Y B, et al. Removal of quinolone resistance bacteria and corresponding resistance genes in a conventional municipal sewage treatment plant [J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2016, 10(3): 1177-1183 (in Chinese)
- [20] Munir M, Wong K, Xagorarakis I. Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan [J]. *Water Research*, 2011, 45(2): 681-693
- [21] Xu J, Xu Y, Wang H M, et al. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river [J]. *Chemosphere*, 2015, 119: 1379-1385
- [22] 毛步云, 黄雅梦, 胡南, 等. 纳米颗粒对污水中耐药细菌的毒性影响及机理[J]. *环境科学与技术*, 2018, 41(12): 20-29
Mao B Y, Huang Y M, Hu N, et al. Study on the toxicity of nanoparticles on antibiotic resistant bacteria in wastewater: Effects and mechanisms [J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 41(12): 20-29 (in Chinese)
- [23] 王佳慧, 贾丹, 李贺海, 等. 尿肠球菌携带毒力基因及其耐药性检测[J]. *中国兽医学*, 2020, 50(11): 1428-

- 1432
Wang J H, Jia D, Li H H, et al. Detection of virulence genes and drug resistance of *Enterococcus faecium* [J]. Chinese Veterinary Science, 2020, 50(11): 1428-1432 (in Chinese)
- [24] Mannu L, Paba A, Daga E, et al. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin [J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 88(2-3): 291-304
- [25] 郑辉. 屎肠球菌裂解性噬菌体 Ec-ZZ2 全基因序列的初步分析[D]. 长春: 吉林大学, 2017: 4-8, 21
Zheng H. Analysis of complete genome of a lytic bacteriophage Ec-ZZ2 infecting *Enterococcus faecium* [D]. Changchun: Jilin University, 2017: 4-8, 21 (in Chinese)
- [26] Kim H, Yoon S C, Lee T Y, et al. Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damages [J]. Toxicology Letters, 2009, 184(1): 13-17
- [27] 段链, 顾雯, 王秦, 等. 实时动态监测纳米氧化铜作用于 CHL 细胞的毒性效应[J]. 癌变·畸变·突变, 2016, 28(3): 205-208, 213
Duan L, Gu W, Wang Q, et al. Real-time dynamic monitoring of cytotoxicity in nano-copper oxide-treated CHL cells [J]. Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis, 2016, 28(3): 205-208, 213 (in Chinese)
- [28] Kasemets K, Ivask A, Dubourguier H C, et al. Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Toxicology in Vitro, 2009, 23(6): 1116-1122
- [29] 项荣, 丁栋博, 范亮亮, 等. 氧化锌的抗菌机制及其安全性研究进展[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(3): 470-475
Xiang R, Ding D B, Fan L L, et al. Antibacterial mechanism and safety of zinc oxide [J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2014, 18(3): 470-475 (in Chinese)
- [30] 徐争启, 倪师军, 虞先国, 等. 潜在生态危害指数法评价中重金属毒性系数计算[J]. 环境科学与技术, 2008, 31(2): 112-115
Xu Z Q, Ni S J, Tuo X G, et al. Calculation of heavy metals' toxicity coefficient in the evaluation of potential ecological risk index [J]. Environmental Science & Technology, 2008, 31(2): 112-115 (in Chinese)
- [31] 李梅. 水环境中 ZnO 纳米颗粒对大肠杆菌的毒性及影响因素[D]. 杭州: 浙江大学, 2012: 30-39
Li M. The toxicity and impact factors of ZnO nanoparticles to *Escherichia coli* in aquatic environment [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012: 30-39 (in Chinese)
- [32] 黄俊, 衣俊, 强丽媛, 等. 粒径和包裹物对纳米银在海洋微藻中的毒性影响[J]. 环境科学, 2016, 37(5): 1968-1977
Huang J, Yi J, Qiang L Y, et al. Contribution of particle size and surface coating of silver nanoparticles to its toxicity in marine diatom *Skeletonema costatum* [J]. Environmental Science, 2016, 37(5): 1968-1977 (in Chinese)
- [33] Mudunkotuwa I A, Rupasinghe T, Wu C M, et al. Dissolution of ZnO nanoparticles at circumneutral pH: A study of size effects in the presence and absence of citric acid [J]. Langmuir, 2012, 28(1): 396-403
- [34] 严玉鹏, 唐亚东, 万彪, 等. 颗粒尺寸对纳米氧化物环境行为的影响[J]. 环境科学, 2018, 39(6): 2982-2990
Yan Y P, Tang Y D, Wan B, et al. Impact of size on environmental behavior of metal oxide nanoparticles [J]. Environmental Science, 2018, 39(6): 2982-2990 (in Chinese)
- [35] 柴汉魁. 四种金属氧化物纳米颗粒对农业土壤微生物的毒性研究[D]. 北京: 北京科技大学, 2017: 5-8
Chai H K. The toxic effect study of four metal oxide nanoparticles on agricultural soil microorganism [D]. Beijing: University of Science and Technology Beijing, 2017: 5-8 (in Chinese)
- [36] 崔宝臣, 马丽景, 白守礼, 等. 纳米 CuO 的制备、表征及其应用[J]. 化工进展, 2004, 23(5): 541-544
Cui B C, Ma L J, Bai S L, et al. Preparation, characterization and application of nanosized-CuO [J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2004, 23(5): 541-544 (in Chinese)
- [37] 杨晓月, 程和发. 水体中金属(氧化物)纳米颗粒的环境行为与污染控制研究进展[J]. 环境化学, 2021, 40(2): 436-449
Yang X Y, Cheng H F. Research progress in the environmental behavior and pollution control of metal and metal oxide nanoparticles in water [J]. Environmental Chemistry, 2021, 40(2): 436-449 (in Chinese)
- [38] Ma Z X, Han Y X, Ma Y D, et al. Bactericidal potency of nano-ZnO [J]. Min Metall, 2004, 13(4): 57-59 ◆