纳米氧化锌对土壤微生物酶活性的影响

侯 珍,陈 卓,沈肇怡,李婷婷,杨君君,卢晓霞*

(北京大学城市与环境学院 地表过程分析与模拟教育部重点实验室,北京 100871)

摘 要:纳米氧化锌(ZnO-NPs)是目前最常见的工程纳米颗粒之一,广泛应用于各类产品中,对生态环境有潜在影响。为了阐明 ZnO-NPs 对土壤微生物酶活性的影响,探讨其作用机制及剂量-效应关系,通过微宇宙实验,分别建立了纯菌(微杆菌)培养体系和 土壤培养体系,对不同浓度 ZnO-NPs 暴露条件下微生物的荧光素二乙酸酯水解酶(FDAH)活性进行了测定,在纯菌培养体系中也 测定了脱氢酶(DH)活性。结果显示,与不含 ZnO-NPs 的对照相比,培养液中 ZnO-NPs 浓度为 1、5、10 mg·L⁻¹时,对微杆菌的 FDAH 和 DH 活性均产生了显著抑制,抑制率分别为 22.5%、61.2%、62.3%和 27.8%、44.8%、44.8%。ZnO-NPs 附着在微杆菌膜上,有些进入 菌体内,对菌体造成了氧化损伤。土壤中 ZnO-NPs 浓度为 5 mg·g⁻¹和 10 mg·g⁻¹时,FDAH 活性显著低于不含 ZnO-NPs 的对照土壤 (*P*=0.007 和 *P*=0.008)。土壤中 ZnO-NPs 浓度为 1 mg·g⁻¹时,FDAH 活性与对照无显著差异(*P*=0.149)。土壤中 ZnO-NPs 对 FDAH 活性的抑制减弱。 关键词:纳米氧化锌;土壤微生物;微杆菌;酶活性;氧化损伤

中图分类号:S154.2 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2014)06-1153-06 doi:10.11654/jaes.2014.06.015

Effects of Zinc Oxide Nanoparticles on Enzyme Activities of Soil Microorganisms

HOU Zhen, CHEN Zhuo, SHEN Zhao-yi, LI Ting-ting, YANG Jun-jun, LU Xiao-xia*

(Laboratory for Earth Surface Processes, College of Urban and Environmental Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO-NPs) are among the most common engineered nanoparticles and widely used in various products, having potential impacts on ecological environment. The purposes of this study were to elaborate the influence of ZnO-NPs on soil microbial enzyme activities and to explore the action mechanism as well as the dose-response relationship. Via microcosm studies, pure bacteria(*Microbacterium* sp.) cultivation system and soil cultivation system were set up, and the microbial activities of Fluorescein Diacetate Hydrolase(FDAH) under the exposure of various concentrations of ZnO-NPs were measured. In the pure bacteria cultivation system, the Dehydrogenase(DH) activities were also measured. The results showed that, compared to the control medium without ZnO-NPs, ZnO-NPs in the liquid medium at concentrations of 1 mg \cdot L⁻¹, 5 mg \cdot L⁻¹ and 10 mg \cdot L⁻¹ significantly inhibited the activities of FDAH and DH of *Microbacterium* sp. with the inhibition rates being 22.5%, 61.2%, 62.3% and 27.8%, 44.8%, 44.8%, respectively. ZnO-NPs attached to the membranes of *Microbacterium* sp. and some entered the interior of the bacteria, causing oxidative damage. At ZnO-NPs concentrations of 5 mg \cdot g⁻¹ and 10 mg \cdot g⁻¹ soil, the activities of FDAH were significantly lower than that in the control (*P*=0.007 and *P*=0.008). At ZnO-NPs concentration of 1 mg \cdot g⁻¹ soil, the activity of FDAH was not significantly different than that in the control (*P*=0.149). The inhibition of FDAH activity was well positively correlated with the concentration of ZnO-NPs. Over the exposure time, the inhibition of ZnO-NPs on FDAH activity decreased.

Keywords: zinc oxide nanoparticles; soil microorganisms; Microbacterium sp.; enzyme activities; oxidative damage

近年来随着纳米科学技术的快速发展,工程纳米颗粒的使用越来越多。纳米氧化锌(ZnO-NPs)是最常

见的工程纳米颗粒之一,广泛用于防晒产品、化妆品、 塑料添加剂、半导体、纺织品以及抗菌剂等领域^[1],在 其生产、使用和处理中,ZnO-NPs不可避免地会释放 到环境中^[2]。然而,目前对ZnO-NPs的生态影响仍知 之甚少。

ZnO-NPs 具有抗菌性,这方面的研究大部分是基 于纯菌。许多细菌,包括致病菌(如大肠杆菌、沙门氏 菌、单核细胞增生李斯特氏菌、金黄色酿脓葡萄球菌

收稿日期:2013-10-21

基金项目:国家自然科学基金项目(41071311,41030529);教育部新世 纪优秀人才项目(NCET-10-0200);霍英东教育基金项目 (114043)

作者简介:侯 珍(1989—),男,河南人,硕士研究生,从事污染物生态 毒理效应研究。E-mail: zhenhou666@126.com

^{*}通信作者:卢晓霞 E-mail:luxx@urban.pku.edu.cn

和空肠弯曲杆菌)和与生态有关的菌(如枯草杆菌、恶 臭假单胞菌和希瓦氏菌)都被用于研究,且多以细菌 的生长为指标^[3-11]。已提出的毒性机制包括:溶解生成 锌离子,产生活性氧簇(ROS),直接与生物靶反应^[12]。

从生态角度看,微生物是有机质的分解者,是水 生和陆地食物链的基础。关于 ZnO-NPs 对土壤微生 物的影响,已有少量研究^[13-16]。Collins 等^[13]报道,ZnO-NPs 可改变土壤微生物的群落结构。Ge 等^[14]的研究也 表明,ZnO-NPs 可降低土壤微生物量和细菌群落结 构多样性。在 Du 等^[15]的研究中,土壤蛋白酶、过氧化 氢酶和过氧化物酶活性受到 ZnO-NPs 的抑制,但土 壤尿酶活性没有受到影响。不同的试验结果与试验条 件如土壤性状、ZnO-NPs 浓度、浸染时间等有关,也 与所选参数有关,需要更多的研究来明确 ZnO-NPs 与土壤酶活性的关系。

本研究目的是阐明 ZnO-NPs 对土壤酶活性的影响,探讨其作用机制及剂量-效应关系。为此,在实验室进行了微宇宙实验,分别建立了纯菌培养体系和土壤培养体系,对不同浓度 ZnO-NPs 暴露条件下各培养体系中的酶活性进行了监测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 纳米氧化锌

ZnO-NPs 粉末(白色,未包裹)购自北京德科岛 金科技有限公司,产品说明中其纯度为 99.9%、平均 粒径 30 nm、比表面积 50 m²·g⁻¹、松装密度 0.3~0.45 g·cm⁻³、真实密度 5.6 g·cm⁻³。本研究使用 vario Micro Cube 元素分析仪测定了 ZnO-NPs 的元素含量,使用 Malvern Zetasizer Nano ZS90 纳米粒径电位分析仪测 定了 ZnO-NPs 的电位,使用 FEI Tecnai F30 透射显微 镜观察了 ZnO-NPs 的形态和大小。

1.1.2 微杆菌

采用平板划线法从北京某地褐土中分离出一株 菌,经生理生化反应和 16S rDNA 分析,鉴定为微杆菌 (*Microbacterium* sp.)。该菌为革兰氏阳性菌,呈短杆 状(宽约 0.5 μm,长 1~3 μm),菌落黄色,表面光滑,半 透明,边缘整齐,有光泽,是好氧的化能异养型细菌。 本研究使用 LB 培养基 (10 g·L⁻¹ 胰化蛋白胨、5 g·L⁻¹ 酵母提取物和 10 g·L⁻¹ NaCl)对微杆菌进行培养。

1.1.3 土壤

土壤采自北京大学未名湖边的坡地上,用镊子剔 出草根和其他碎屑物后过 200 目筛。使用 Mettler Toledo 320 pH 值计分析了土壤 pH 值。使用 Shimadzu TOC-5000A TOC 分析仪测定了土壤总有机碳(TOC) 含量。根据烘干法测定了土壤的湿度、碱水解法测定 了土壤的有效氮、碳酸氢钠法测定了土壤的有效磷^[17]。 采用菌落计数法测定了土壤中微生物数量^[17]。

1.2 试验方法

1.2.1 纳米氧化锌对培养液中微杆菌酶活性的影响

设置四组,即对照(不加 ZnO-NPs)和三种不同 浓度 ZnO-NPs 处理组(1、5、10 mg·L⁻¹),浓度梯度的 设置以文献为依据。Boxall 等^[2]建立了一个简化模型 和算法,用于估算水、土壤和大气中工程纳米颗粒物 的浓度:假定市场 10%的工程纳米颗粒物进入环境, 则水中 ZnO-NPs 的浓度在 mg·L⁻¹范围。本实验具体 做法如下:

(1)配制基础培养基。在高纯水(Milli-Q水)中加入1g·L⁻¹NH₄Cl、0.1g·L⁻¹MgSO₄·7H₂O、0.05g·L⁻¹CaCl₂·2H₂O、1.9g·L⁻¹KH₂PO₄、1.7g·L⁻¹Na₂HPO₄和1mL·L⁻¹微量金属混合液,高温(121℃)灭菌30min,冷却至常温,通过0.22μm滤膜注射加入维生素混合液(0.1mL·L⁻¹)。

(2)配制 ZnO-NPs 悬浊液。称取 10 mg ZnO-NPs 粉末,溶于 100 mL 高温灭菌过的高纯水,超声波振荡 30 min 后备用。

(3)配制微杆菌接种液。取 120 mL LB 培养的微杆 菌分装于四个 50 mL 离心管中进行离心(5000 r·min⁻¹), 去上清液,用基础培养基清洗一次后,每个离心管中 加入 15 mL 基础培养基,摇动混匀后备用。

(4)在四个高温灭菌过的 500 mL 锥形瓶中分别 加入 300 mL 基础培养基,每个锥形瓶接种 15 mL 微杆 菌液(接种后培养液中微杆菌数量约为 10⁸ 个·mL⁻¹), 在其中三个锥形瓶中分别加入 3、16、33 mL ZnO-NPs 悬浊液。该步骤在超洁净工作台内进行,所有锥形瓶 用透气的封口膜盖住瓶口,在气浴恒温振荡器(SHZ-82A)内振荡培养(转速 200 r·min⁻¹,20 ℃)。在试验开 始(第 0 d)和结束时(第 7 d),分别从各个锥形瓶中取 水样,测定荧光素二乙酸酯水解酶(FDAH)活性和脱 氢酶(DH)活性,每种测定做三个平行。此外,在试验 结束时,从不同培养液中取水样进行透射电镜观察。

为阐明 ZnO-NPs 对微杆菌的毒性机制,对不同 培养液中微杆菌的超氧化物歧化酶(SOD)活性进行 了测定。设置三组培养液,分别为对照、10 mg·L⁻¹ ZnO-NPs 培养液和 10 mg·L⁻¹ Zn²⁺培养液,接种相同 量(各 0.2 mL)微杆菌,每组做三个平行。所有锥形瓶

农业环境科学学报 第 33 卷第 6 期

均在 30 ℃摇床振荡培养 48 h, 然后从各个瓶中取菌 液 1 mL,以 10 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,加生理盐水 0.3 mL,冰水浴超声 4 s×3 次破碎细胞(间隔 10 s),用 SOD 测定试剂盒(购自南京建成生物工程研究所)进 行测定。

1.2.2 纳米氧化锌对土壤中微生物酶活性的影响

设置四组,即对照(新鲜土,不加 ZnO-NPs)和三 种不同浓度 ZnO-NPs 处理组(每克新鲜土中分别加 入 1、5、10 mg ZnO-NPs)。浓度梯度的设置以文献为 依据^[2]。已有研究显示,与湿混合相比,干混合可使土 壤中 ZnO-NPs 的分布更为均匀^[18],因此本研究采用 干混合的方式将 ZnO-NPs 混入新鲜土壤。具体做法 如下:

(1)将实验土壤分成四份,每份150g。

(2)从每份土壤中取 10g ±,105 ℃烘干,碾磨成 粉末,将其中三份烘干土分别与 150、750、1500 mg ZnO-NPs 充分混合,然后分别加入 140g 新鲜土,用 搅拌器混匀,另一份烘干土直接加入 140g 新鲜土, 用搅拌器混匀。各处理土壤分装入三个 50 mL 锥形瓶 中(每个瓶内 50g ±),用透气的封口膜盖住瓶口,在 暗室中静置培养。

(3)试验期间,每周称重,观察土壤的水分变化情况。若有水分损失,添加适量的高纯水,使土壤保持一定的湿度(水分含量约5%)。

(4)在试验的不同阶段,从各个锥形瓶中取样测 定土壤的 FDAH 活性。

1.3 酶活性测定

1.3.1 荧光素二乙酸酯水解酶活性

采用比色法测定 FDAH 活性。以无色的荧光素 二乙酸为基质,在菌培养液或土壤中荧光素二乙酸酯 酶的作用下依次发生水解和脱氢反应,最后生成黄色 的荧光素,该产物在波长 490 nm 处有最大吸光值,用 紫外分光光度计(Unicam UV-100)进行测定。对于菌 培养液,测定所用样品量为 5 mL;对于土壤,测定所 用样品量为 5 g。具体操作见文献[17]。

1.3.2 脱氢酶活性

采用比色法测定 DH 活性。以 2,3,5-三苯基四 氮唑氯化物(TTC)为基质,在菌培养液脱氢酶的作用 下形成红色的三苯基甲臢(TPF),该产物在波长 485 nm 处有最大吸光值,用紫外分光光度计进行测定。测 定所用样品量为 5 mL,具体操作见文献[17]。

1.4 数据处理

用 Visual MINTEQ 软件计算菌培养液中溶解的

Zn(Ⅱ)浓度。用 Microsoft Excel 2007 和 SPSS 18 处理数据。采用成对学生 *t* 检验比较对照和不同处理组数据的差别,显著性水平为 0.05。酶活性抑制率的计算公式如下:

酶活性抑制率(%)=100%×(A_{对照}-A_{处理})/A_{对照} 式中:A_{对照}为对照组中的酶活性;A_{处理}为处理组中的 酶活性。

2 结果与讨论

2.1 纳米氧化锌的性质表征

所用 ZnO-NPs 粉末中 ZnO 含量为 99.8%、Fe₂O₃ 含量为 0.051%、PbO 含量为 0.046%。ZnO-NPs 水溶 液(10 mg·L⁻¹)中,ZnO-NPs 水动力直径为 630 nm,平 均ζ电位为-20 mV。ZnO-NPs 主要呈杆状,长度<300 nm,宽度<80 nm;小部分 ZnO-NPs 呈球状,直径<70 nm。图 1显示所用 ZnO-NPs 的透射电镜(TEM)图像。



图 1 试验所用 ZnO-NPs 的透射电镜图像 Figure 1 TEM images of the studied ZnO-NPs

2.2 纳米氧化锌对培养液中微杆菌酶活性的影响

土壤是一个复杂的系统。为了解 ZnO-NPs 对土 壤微生物酶活性的影响,先以土壤中分离出的一株纯 细菌(微杆菌)为对象,研究了 ZnO-NPs 的影响。酶活 性采用两种指标,即 FDAH 活性和 DH 活性。由于土 壤中的许多酶(如脂肪酶、蛋白酶、酯酶等)均可参与 FDAH 的水解,FDAH 活性已被用来表征土壤中微生 物的总酶活性¹⁰⁹。DH 是催化土壤中物质氧化还原反 应的一类重要酶。图 2 和图 3 分别显示在不同浓度 ZnO-NPs 条件下,经过 1 周时间,微杆菌培养液中 FDAH 和 DH 活性的变化。暴露起始时,不同浓度 ZnO-NPs 培养液中微杆菌 FDAH 和 DH 活性与对照 中的差别不显著。暴露 1 周后,与对照相比,不同浓度 ZnO-NPs 培养液中微杆菌 FDAH 和 DH 活性均有显 著下降(*P*值 0.001~0.011)。若以 1 周后对照中 FDAH 和 DH 活性为准计算抑制率,则 1、5、10 mg·L⁻¹ ZnO-

农业环境科学学报 第 33 卷第 6 期











NPs 处理组中 FDAH 和 DH 活性抑制率分别为 22.5%、61.2%、62.3%和 27.8%、44.8%、44.8%。5、10 mg·L⁻¹ZnO–NPs 处理组中 FDAH 和 DH 活性均显著 低于 1 mg·L⁻¹ZnO–NPs 处理组(*P*值 0.004~0.050), 但 5、10 mg·L⁻¹ZnO–NPs 处理组中 FDAH 和 DH 活性 差异不显著。在中高浓度 ZnO-NPs 的培养液中, ZnO-NPs 发生团聚,如图 4 所示。这可能是 FDAH 和 DH 活性抑制率与 ZnO-NPs 浓度没有显著线性关系 的原因之一。

2.3 纳米氧化锌对培养液中微杆菌酶活性的毒性机制

为明确培养液中 ZnO-NPs 对微杆菌的毒性机 制,用 Visual MINTEQ 软件计算了不同浓度 ZnO-NPs 条件下培养液中溶解的 Zn(II)浓度。结果显示,1、5、 10 mg·L⁻¹ ZnO-NPs 培养液中溶解的 Zn(II)浓度分 别为 0.8、1.3、1.3 mg·L⁻¹,低于文献中报道的 Zn(II) 对链酶菌的毒性阈值 36 mg·L^{-1[20]},以及对芽孢杆菌、 假单胞菌、大肠杆菌和节细菌的毒性阈值 1.9、2.8、5.6 mg·L⁻¹和 12.9 mg·L^{-1[21]}。对 1 周后的微杆菌培养液进 行电镜观察,发现在不同浓度 ZnO-NPs 处理组中, ZnO-NPs 均附着在菌膜上,有些进入了菌体内,如图 5 所示(以 10 mg·L⁻¹ ZnO-NPs 处理组为例)。ZnO-NPs 附着在菌膜上,对菌的形态产生了一定影响,如使菌 膜某些部位变形或凹陷,改变菌膜的渗透性。Liu 等^[5] 报道,ZnO-NPs 进入细菌体内后,可使胞内代谢系统



(a)对照;(b)ZnO-NPs 培养液(10 mg·L⁻¹)
(a)Control;(b)ZnO-NPs medium(10 mg·L⁻¹)
图 5 对照和 ZnO-NPs 培养液中微杆菌形态
Figure 5 Morphologies of *Microbacterium* sp. in the control and the ZnO-NPs medium



(a)1 mg•L⁻¹

(b)5 mg·L⁻¹

 $(c)10 \text{ mg} \cdot L^{-1}$

图 4 不同浓度 ZnO-NPs 在培养液中的形态 Figure 4 The morphologies of ZnO-NPs of various concentrations in liquid mediums

发生紊乱、生物化学成分发生改变(受影响最大的是油脂和蛋白质), 菌膜的损坏也会导致菌体内的物质发生泄漏,使菌死亡。Xie等响的研究也表明,ZnO-NPs 会使细菌形态发生改变、菌膜渗漏,并使菌体内氧化应激基因表达显著升高。

本研究中,对不同培养条件下(对照、10 mg·L⁻¹ ZnO-NPs 和 10 mg·L⁻¹Zn²⁺)微杆菌的 SOD 活性进行 了比较,如图 6 所示。与对照相比,微杆菌在 10 mg·L⁻¹ ZnO-NPs 培养液中暴露 48 h 后,SOD 活性显著降低 (*P*值 0.006),但在 10 mg·L⁻¹Zn²⁺培养液中暴露 48 h 后,SOD 活性变化不大。SOD 是生物体氧化损伤的一 个指标。这表明,ZnO-NPs 引起了微杆菌的氧化损 伤,该作用是因 ZnO-NPs 的纳米特性造成,而非其溶 解释放的 Zn²⁺造成。



2.4 纳米氧化锌对土壤中微生物酶活性的影响

实验土壤为褐土,pH为7.1、水解氮含量为(67.4± 3.4)mg·kg⁻¹、速效磷含量为(20.2±1.1)mg·kg⁻¹、TOC含 量为 1.4%±0.1%、水含量为 4.9%±0.3%。土壤中细菌 含量约为10⁷CFU·g⁻¹土。因实验土壤量较少,仅选择 FDAH 活性作为毒理指标,研究结果见图 7。与培养 液相比,土壤中 FDAH 的测定值波动更大,可能与土 壤的不均匀性有关。不同处理土壤中 FDAH 随时间 的变化规律基本一致,可能与测定的系统误差有关。 尽管在每个取样时间点,不同处理土壤中 FDAH 活 性在 0.05 水平上无显著差异,但若将三个取样时间 点的数据放在一起进行比较,则在实验期间土壤中 ZnO-NPs 浓度为 5 mg·g⁻¹ 和 10 mg·g⁻¹ 时 FDAH 活性 显著低于不含 ZnO-NPs 的对照土壤(P=0.007 和 P= 0.008), 而土壤中 ZnO-NPs 浓度为 1 mg·g⁻¹ 时 FDAH 活性与对照无显著差异(P=0.149)。FDAH 活性与 ZnO-NPs 浓度相关。若以对照中 FDAH 活性为准计



算抑制率,则ZnO-NPs处理土壤中FDAH活性抑制 率与 ZnO-NPs 浓度对数呈显著的正相关关系(R= 0.993, P=0.036)。若以各取样时间点对照土壤中 FDAH 活性为准计算抑制率,则随着暴露时间的延 长,不同浓度 ZnO-NPs 对土壤中 FDAH 活性的抑制 均减弱。例如,在 ZnO-NPs 浓度为 10 mg·g⁻¹ 土壤中, 第1d、第15d和第30d时FDAH活性抑制率分别为 52.8%、31.5%和 29.3%;在 ZnO-NPs 浓度为 5 mg·g⁻¹ 土壤中,第1d、第15d和第30d时FDAH活性抑制 率分别为 38.7%、29.1%和 24.6%。有研究表明,ZnO-NPs 进入土壤后,其生物有效性和毒性逐渐减低。例 如,在Waalewijn-Kool等凹的研究中,未包裹的ZnO-NPs 对新鲜浸染土壤(0.1~6.4 mg Zn·g⁻¹ 土)中的白符 跳(弹尾目属)有毒,但对老化了3、6、12个月土壤中 的白符跳无毒。土壤有机质和粘土矿物对金属氧化物 有很高的结合力^[23],可能是土壤中 ZnO-NPs 毒性逐 渐变低的原因之一。

目前关于纳米材料对土壤中微生物的影响存在 一定分歧。有些研究结果表明没有影响或影响不大, 例如:Johansen等^[24]报道,土壤中加入高达 50 mg·kg⁻¹ 的富勒烯,对土壤呼吸和微生物量没有影响;Tong等^[25] 的研究表明,富勒烯(1 mg·g⁻¹ 土)对微生物群落结构 和土壤酶活性(α-葡萄糖苷酶、酸性磷酸酶、脱氢酶 和脲酶)的影响较小。然而,也有研究结果表明影响显 著,例如:Jin等^[26]和 Chung等^[27]报道,单壁碳纳米管 (300~1000 μg·g⁻¹ 土)和多壁碳纳米管(500~5000 μg· g⁻¹ 土)可显著降低土壤中纤维二糖水解酶、β-1,4-葡萄糖苷酶、β-1,4-木糖苷酶、β-1,4-N-乙酰葡糖 胺糖苷酶和磷酸(酯)酶活性及微生物量;Shin等^[28]报 道纳米银可抑制土壤中脲酶、酸性磷酸酶、芳香基硫酸 酯酶、β-葡萄糖苷酶、脱氢酶和荧光素二乙酸酯水解 酶活性。由于不同试验所用纳米材料、土壤、暴露浓度 和时间不同,导致所得结果有差异,需要进行更多的研 究来加深纳米材料对土壤微生物影响的认识。

3 结论

(1)在纯菌(微杆菌)液体培养体系中,ZnO-NPs 浓度为1、5、10 mg·L⁻¹时,对纯菌的FDAH和DH活 性均产生显著的抑制。ZnO-NPs附着在微杆菌膜上, 有些进入了菌体内,对菌体造成了氧化损伤。

(2)在土壤培养体系中,土壤中 ZnO-NPs 浓度为5 mg·g⁻¹和 10 mg·g⁻¹时,FDAH 活性显著低于不含ZnO-NPs 的对照土壤。土壤中 ZnO-NPs 浓度为 1 mg·g⁻¹时,FDAH 活性与对照无显著差异。随着暴露时间的延长,ZnO-NPs 对 FDA 水解酶活性的抑制减弱。

参考文献:

- Li J H, Liu X R, Zhang Y, et al. Toxicity of nano zinc oxide to mitochondria[J]. *Toxicology Research*, 2012, 1:137–144.
- [2] Boxall A, Chaudhry Q, Sinclair C, et al. Current and future predicted environmental exposure to engineered nanoparticles[M]. London: Central Science Laboratory, York, UK, 2007.
- [3] Applerot G, Lipovsky, Dror R, et al. Enhanced antibacterial activity of nanocrystalline ZnO due to increased ROS-mediated cell injury[J]. Advanced Functional Materials, 2009, 19:842–852.
- [4] Jin T, Sun D, Su J Y, et al. Antimicrobial efficacy of zinc oxide quantum dots against Listeria monocytogenes, Salmonella enteritidis, and Es – cherichia coli O157: H7[J]. Journal of Food Science, 2009, 74: M46– M52.
- [5] Liu Y, He L, Mustapha A, et al. Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against *Escherichia coli* 0157:H7[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107:1193–1201.
- [6] Xie Y, He Y, Irwin P L, et al. Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77:2325–2331.
- [7] Adams L K, Lyon D Y, Alvarez P J J. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions[J]. *Water Research*, 2006, 40:3527-3532.
- [8] Gajjar P, Pettee B, Britt D W, et al. Antimicrobial activities of commercial nanoparticles against an environmental soil microbe, *Pseudomonas putida* KT2440[J]. Journal of Biological Engineering, 2009, 3:9.
- [9] Jones N, Ray B, Ranjit K T, et al. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms[J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 279:71–76.
- [10] Wu B, Wang Y, Lee Y H, et al. Comparative eco-toxicities of nano-ZnO particles under aquatic and aerosol exposure modes[J]. Environmental Science & Technology, 2010, 44: 1484–1489.
- [11] 葛 钼,肖 琳.氧化锌纳米颗粒对大肠杆菌的毒性效应及机制[J].安徽农业科学,2013,41(9):3919-3922.

GE Mu, XIAO Lin. Toxicity effects and mechanism of ZnO nanoparticles on *Escherichia coli*[J]. *Journal of Anhui Agriculture Science*, 2013, 41(9):3919-3922.

- [12] Ma H, Williams P L, Diamond S A. Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles: A review[J]. Environmental Pollution, 2013, 172:76–85.
- [13] Collins D, Luxton T, Kumar N, et al. Assessing the impact of copper and zinc oxide nanoparticles on soil: A field study[J]. PLoS One, 2012, 7:42663.
- [14] Ge Y, Schimel J P, Holden P A. Evidence for negative effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles on soil bacterial communities[J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45:1659–1664.
- [15] Du W C, Sun Y Y, Ji R, et al. TiO₂ and ZnO nanoparticles negatively affect wheat growth and soil enzyme activities in agricultural soil [J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 2011, 13:822.
- [16] Rousk J, Ackermann K, Curling S F, et al. Comparative toxicity of nanoparticulate CuO and ZnO to soil bacterial communities[J]. *PLoS* One, 2012, 7:34197.
- [17] 李振高, 骆永明, 滕 应. 土壤与环境微生物研究法[M]. 北京:科学 出版社, 2008.

LI Zhen-gao, LUO Yong-ming, TENG Ying. Research methods of soil and environmental microorganisms[M]. Beijing: Science Press, 2008.

- [18] Hund-Rinke K, Schlich K, Klawonn T. Influence of application techniques on the ecotoxicological effects of nanomaterials in soil[J]. *Environmental Sciences Europe*, 2012, 24:30.
- [19] Green V S, Stott D E, Diack M. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2006, 38:693-701.
- [20] Majzlik P, Strasky A, Adam V, et al. Influence of zinc(II) and copper(II) ions on Streptomyces bacteria revealed by electrochemistry[J]. International Journal of Electrochemical Science, 2011, 6:2171–2191.
- [21] Nweke C O. Kinetics of zinc toxicity to environmental bacterial isolate [J]. Ambi-Agua, Taubate, 2009, 4:23–34.
- [22] Waalewijn-Kool P L, Ortiz M D, van Straalen N M, et al. Sorption, dissolution and pH determine the long-term equilibration and toxicity of coated and uncoated ZnO nanoparticles in soil[J]. *Environmental Pollution*, 2013, 178:59–64.
- [23] Voegelin A, Pfister S, Scheinost A C, et al. Changes in zinc speciation in field soil after contamination with zinc oxide[J]. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39:6616–6623.
- [24] Johansen A, Pedersen A L, Jensen K A, et al. Effects of C₆₀ fullerene nanoparticles on soil bacteria and protozoans[J]. *Environmental Toxi*cology and Chemistry, 2008, 27:1895–1903.
- [25] Tong Z H, Bischoff M, Nies L, et al. Impact of fullerene(C₆₀) on a soil microbial community[J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41:2985–2991.
- [26] Jin L, Son Y, Yoon T K, et al. High concentrations of single-walled carbon nanotubes lower soil enzyme activity and microbial biomass[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2013, 88:9–15.
- [27] Chung H, Son Y, Yoon T K, et al. The effect of multi-walled carbon nanotubes on soil microbial activity[J]. *Ecotoxicology and Environmen*tal Safety, 2011, 74:569–575.
- [28] Shin Y J, Kwak J, An Y J. Evidence for the inhibitory effects of silver nanoparticles on the activities of soil exoenzymes[J]. *Chemosphere*, 2012, 88:524–529.