

DOI:10.3876/j.issn.1000-1980.2023.01.006

纳米氧化锌颗粒对滨海湿地微生物群落的影响

荣馨宇¹, 韩蕊², 张殿光¹, 王晶¹, 李可心¹, 王伟¹, 叶坤¹, 吴英海¹

(1. 大连海洋大学海洋与土木工程学院, 辽宁 大连 116023; 2. 大连海洋大学设施渔业教育部重点实验室, 辽宁 大连 116023)

摘要: 利用滨海湿地模拟系统研究纳米氧化锌颗粒(ZnO NPs)对滨海湿地周期淹水区和长期淹水区微生物群落组成和多样性的影响,采用16S rRNA扩增子测序查明发生显著性变化的微生物。结果表明:ZnO NPs暴露下微生物群落的相对丰度和多样性均受到不同程度的影响;ZnO NPs质量浓度的大小是驱动滨海湿地环境中微生物群落相对丰度、 β 多样性变化的重要原因。随着ZnO NPs质量浓度的增大,ZnO NPs团聚后增大的纳米材料颗粒粒径减弱了对微生物群落的影响; β 多样性在ZnO NPs质量浓度为80 mg/L时最低;周期淹水区的微生物群落受到的影响比长期淹水区微生物群落受到的影响小,不同淹水条件导致出现不同分类水平的显著差异细菌;周期淹水区和长期淹水区不同的环境条件(如溶解氧、有机质)导致微生物群落丰度、多样性受ZnO NPs的影响表现不同。

关键词: 纳米材料;微生物群落;相对丰度;滨海湿地;生态毒性

中图分类号:X172

文献标志码:A

文章编号:1000-1980(2023)01-0043-09

Effect of ZnO nano particles on bacterial community in coastal wetlands

RONG Xinyu¹, HAN Rui², ZHANG Dianguang¹, WANG Jing¹, LI Kexin¹, WANG Wei¹, YE Kun¹, WU Yinghai¹

(1. College of Marine and Civil Engineering, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

2. Key Laboratory of Environment Controlled Aquaculture of Ministry of Education, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

Abstract: The effects of ZnO nano particles (ZnO NPs) on the composition and diversity of microbial communities in the periodic and long-term submerged areas of coastal wetlands were studied with coastal wetland simulation systems, and the microbes with significant changes were identified by 16S rRNA amplicon sequencing. The results showed the relative abundances and diversities of microbial communities were varyingly affected under the ZnO NPs exposure. ZnO NPs concentration was an important factor that motivated the changes of relative abundances and β diversities of microbial communities in coastal wetland environment. With the increase of the concentration of ZnO NPs, the increased particle size of NPs after agglomeration weakened the impact on microbial community. β diversity was the lowest when the mass concentration of ZnO NPs was 80 mg/L. The influence on microbial community in the periodic submerged area was smaller than that in the long-term submerged area and submerging conditions lead to significantly different bacteria with different classification levels. Different environmental conditions (e. g. dissolved oxygen and organic matter) in periodic submerging area and long-term submerging area led to different effects of ZnO NPs on microbial abundance and community diversity.

Key words: nanomaterial; microbial community; relative abundance; coastal wetland; ecotoxicity

纳米材料颗粒(NPs)是指尺寸在1~100 nm之间,具有小尺寸效应、宏观量子隧道效应以及表面效应的物质,在医疗、军事、工业等领域应用广泛^[1]。而随着纳米材料的不断发展,一些纳米材料如纳米银、纳米氧化锌、纳米二氧化钛、纳米氧化铈等也被应用于商业。鉴于NPs向环境释放量的日益增加,其安全性问题引起了世界范围的广泛关注^[1],而由于纳米氧化锌使用量逐年增加,其在水环境、沉积物环境中累积产生的生态效应以及通过食物链对人体健康产生的威胁不容忽视。

随着沿海城市的迅速发展,滨海湿地作为人类活动的密集区,存在着环境污染和生态破坏等问题。滨海湿地微生物对初级生产力、污染物迁移转化和滨海养殖业生产等具有重要的作用^[2],而滨海湿地沉积物是

基金项目:辽宁省科学技术计划(2021JH2/10200012, 2019JH2/10200007);大连市支持高层次人才创新创业项目(2020RQ0111)

作者简介:荣馨宇(1997—),女,硕士研究生,主要从事水污染控制技术研究。E-mail: 578972627@qq.com

通信作者:吴英海(1979—),男,副教授,博士,主要从事微生物聚集与调控研究。E-mail: wuyinghai@dlo.u.edu.cn

引用本文:荣馨宇,韩蕊,张殿光,等.纳米氧化锌颗粒对滨海湿地微生物群落的影响[J].河海大学学报(自然科学版),2023,51(1):43-51.

RONG Xinyu, HAN Rui, ZHANG Dianguang, et al. Effect of ZnO nano particles on bacterial community in coastal wetlands[J]. Journal of Hohai University(Natural Sciences), 2023, 51(1):43-51.

纳米氧化锌颗粒(ZnO NPs)的归宿之一,因此滨海湿地正面临着 NPs 生态毒性的威胁^[3]。研究发现,污水处理厂出水中含有 ZnO NPs,并具有累积效应,其在污水处理厂污泥中质量分数可达 3 000 mg/kg^[4]。因此,在污水处理厂排海的排污口及污染的河口附近等区域均可能出现 ZnO NPs 的高浓度累积。Li 等^[5]研究了质量浓度为 100 mg/L 的 ZnO NPs 对大肠杆菌(*Escherichia coli*)的影响;Peng 等^[6]研究了质量浓度分别为 10 mg/L、40 mg/L 和 80 mg/L 的 ZnO NPs 对海洋生物的影响;Bao 等^[7]研究发现质量分数为 963 ~ 1 011 mg/kg 的 ZnO NPs 在 7 d 和 50 d 时均显著改变了两个淡水湖泊沉积物中微生物群落的结构和氮循环。ZnO NPs 还可以通过人们在滨海浴场中使用的防晒霜直接进入滨海环境。已有研究发现,ZnO NPs 对滨海河口环境微生物存在生态毒性^[8]。王宁等^[9]总结了 ZnO NPs 在水环境中的毒性效应以及存在的问题。Cai 等^[10]认为,纳米材料与细胞膜接触后,可能诱导细胞膜蛋白质和脂质分子发生改变,其稳定性和完整性将受到破坏。

ZnO NPs 对生物的毒性程度与其质量浓度大小、粒径等密切相关。研究发现,ZnO NPs 对水处理微生物的毒性呈现出剂量效应关系^[11]。此外,ZnO NPs 对生物的影响程度可能还取决于生物自身的耐受力。杜京京等^[12]研究表明,ZnO NPs 对水生丝状真菌以及细菌的代谢功能有明显的抑制作用,而暴露于 ZnO NPs 土壤中的硝化螺旋菌门(*Nitrospirae*)和放线菌门(*Actinobacteria*)的相对丰度会发生明显变化^[13]。目前关于 ZnO NPs 对自然湿地、人工湿地、传统污水构筑物等环境中微生物的影响研究结果差异较大^[1,3,7],这可能是由于不同环境中不同的理化条件形成了不同的微生物群落或代谢特征。

滨海湿地周期淹水区与长期淹水区沉积物理化性质存在差异,如,涨潮时部分滨海湿地被淹没,沉积物中溶解氧(DO)浓度较低,而退潮时湿地裸露在空气中,DO 又得到恢复,因此可以认为,滨海湿地不同微生物的群落多样性和空间差异性与潮汐周期性变化相关^[14]。

为了探明污染严重的滨海湿地(如海岸污水口附近)微生物群落在 ZnO NPs 作用下的演替规律,本文设计制作了滨海湿地涨、落潮模拟装置,根据涨、落潮规律模拟周期淹水区和长期淹水区,基于 16S rRNA 扩增子测序分析了暴露于不同 ZnO NPs 质量浓度和淹水区微生物群落的差异。

1 材料与方法

1.1 反应器、运行和采样

试验系统由 4 套滨海湿地涨、落潮模拟装置组成,每套装置包括有机玻璃制成的无盖槽体反应器(1 m × 0.06 m × 0.5 m)、海水储水箱、多通道蠕动泵、曝气泵、硅胶管以及滨海湿地泥沙等(图 1)。有机玻璃箱体内填入采自大连黑石礁附近海域(121°33′34.8″E,38°52′9.78″N)滨海湿地 0 ~ 40 cm 深、中、浅层的泥沙,采集点间隔 0.5 m,按层填充至反应器中,泥沙倾斜坡度为 15°。

4 个槽体反应器编号分别为 T1、T2、T3 和 C(对照处理)。使用商用的 ZnO NPs 进行试验,其编号为 No. Z112847,粒径为(30±10) nm。鉴于 ZnO NPs 在环境中不断累积,污水处理厂排海的排污口及污染河口附近等区域均可能出现 ZnO NPs 的高浓度累积。根据 Li 等^[5-7]的研究成果,质量浓度设定范围为 10 ~ 120 mg/L,向 T1、T2 和 T3 槽体投加质量浓度分别为 40 mg/L、80 mg/L 和 120 mg/L 的 ZnO NPs,C 槽为空白对照组。ZnO NPs 投加前经过 1 h 的超声波(25 °C、250 W、40 Hz)处理,防止 NPs 团聚。试验在室温下运行,根据大连涨落潮规律,每 12 h 为一个周期,包括 6 h 的涨潮期和 6 h 的落潮期。通过调节蠕动泵,使海水以相同的速度从各自的海水储水箱中进入试验装置,调节上、下出水口阀,使水位分别达到高水位和低水位。每天在 9:30 和 21:30 模拟落潮期,阀门打开时,水通过重力自动排出。当下降到最低水位时,海水通过蠕动泵在系统中循环。沉积物一半在周期淹水区,另一半在长期淹水区。用微型曝气泵曝气维持海水中 DO 质量浓度为(8.0±0.2) mg/L,考虑海水蒸发量,及时补充等量海水。由于水力扰动不大,运行过程中泥沙的倾斜角度基本不发生变化。试验运行 21 d 后取底泥样品,取样深度为 10 cm(图 1)。取 4 个周期淹水区(H)样品(编号为 CH、T1H、T2H、T3H,每个样品 3 个重复),4 个长期淹水区(L)样品(编号为 CL、T1L、T2L、T3L,每个

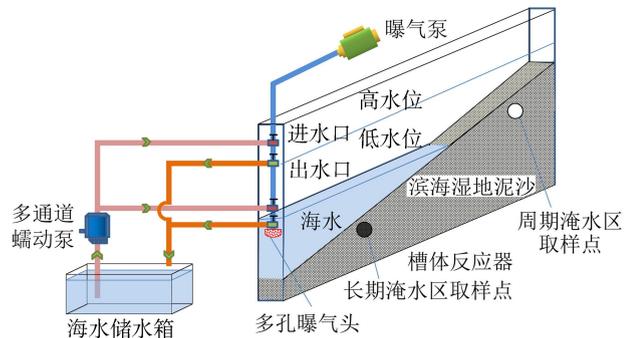


图 1 滨海湿地涨落潮模拟装置

Fig. 1 Simulation device of rising and falling tides in coastal wetland

样品 3 个重复),共 24 个样品,使用前冷藏。

1.2 DNA 提取与高通量测序

沉积物样品 DNA 提取、检测和测定参照文献[15]。使用 MO-BIO PowerSoil[®] DNA 提取试剂盒(MO BIO Laboratories, Inc, Carlsbad, USA)按照说明提取沉积物样本 DNA,利用分光光度计(Thermo Genesys 10 s)测定提取的 DNA 浓度。提取的基因组 DNA 要经过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,并保存在-20℃ 备用。测序引物为 515F(5'-GTG CCA GCM GCC GCG GTA A-3')和 806R(5'-GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT-3')^[16]。聚合酶链反应(PCR)按照文献[15]的步骤与方法进行,再进行 PCR 产物的纯化。根据扩增的 16S 区域特点构建小片段文库,扩增子经过混合后,在北京诺和基因科技有限公司 Illumina MiSeq 平台上进行双末端测序。

1.3 高通量测序数据处理

测序得到的原始数据存在一定比例的干扰数据,为了使信息分析结果更加准确、可靠,对原始数据进行拼接、过滤,得到有效数据。修剪掉 3'端质量小于 30 的部分,将质量序列按 97% 相似度聚类为分类操作单元(operational taxonomic units, OTUs),将相似度大于 97% 的序列聚类成一个 OTU,然后对得到的 OTU 表格和序列进行分析。在 80% 阈值处对每个 OTU 的代表序列进行物种注释,得到对应的物种信息和基于物种的丰度分布情况^[15]。

1.4 物种分布及差异分析方法

选取每个样本在纲分类水平上最大丰度排名前 15 的纲,生成相对丰度柱形图。再根据所有样本在科水平的物种注释及丰度信息,选取丰度排名前 35 的科,根据其在每个样本中的丰度信息,从物种和样本两个层面进行聚类,绘制成科水平热图。将聚类得到的样本 OTUs 结果进行均一化处理,分析不同样本(组)之间共有、特有的 OTUs,绘制花瓣图。根据所有样本的物种注释结果和 OTUs 的丰度信息,将相同分类的 OTUs 信息合并处理得到物种丰度信息表,构建 Weighted Unifrac 距离。为了研究不同样本间的相似性,通过非度量多维尺度分析(non-metric multi-dimensional scaling, NMDS)和 β 多样性指数组间差异分析等方法发现不同样本(组)间的差异。使用 R 软件(Version 2.15.3)绘图;LEfSe(LDA effect size)分析使用 LEfSe 软件,阈值设为 4。

1.5 沉积物表面 NPs 形貌分析方法

对每个处理周期淹水区同样高度位置随机采集 5 处,共采集 5 g 沉积物,混匀后取其中 2 g 进行冷冻干燥;然后使用蔡司 Orion NanoFab 显微镜观测沉积物表面 ZnO NPs 的形貌。设置模式为 NanoFab,扫描停顿(留)时间为 0.2 μ s,工作距离为 8.768 ~ 9.675 mm,射束电流为 0.13 ~ 1.15 pA,扫描尺寸为 1024×1024 像素,GFIS 视野为 1 microns。

2 结果与分析

2.1 纲水平和科水平微生物群落的相对丰度

从图 2 可以看出,当稀释曲线趋向平坦时,更多的数据量只会产生少量新的 OTUs,说明从样本中随机抽取的测序数据量合理。16S rRNA 高通量测序共检测出 80 个纲水平细菌。图 3 为沉积物中纲水平相对丰度前 15 位优势微生物类群的相对丰度,如 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)占 25% ~ 35%,拟杆菌纲

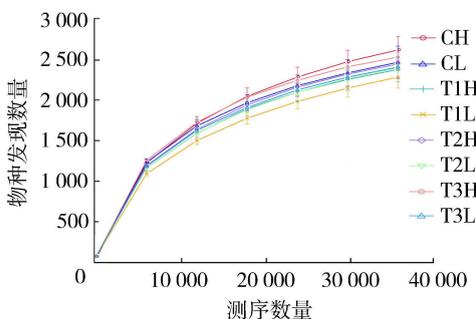


图 2 反映测序数量的稀释曲线

Fig. 2 Dilution curve reflecting the amount of sequencing data

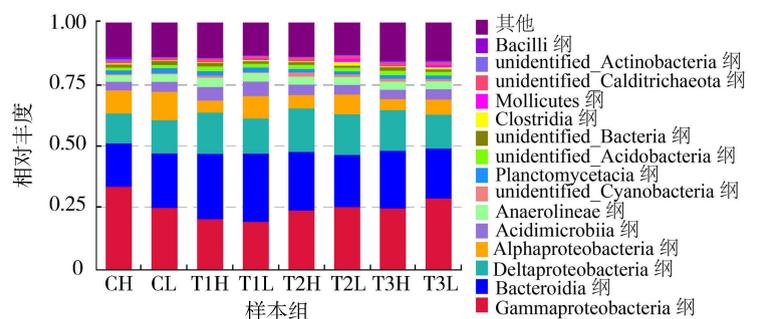


图 3 微生物群落纲水平优势细菌的相对丰度

Fig. 3 Relative abundance of dominant bacterial groups at class level

(Bacteroidia) 占 15% ~ 25%, δ -变形菌纲 (Deltaproteobacteria) 占 10% ~ 15%, α -变形菌纲 (Alphaproteobacteria) 占 5% ~ 10%, 酸杆菌纲 (Acidimicrobiia) 占 2% ~ 5%, 厌氧绳菌纲 (Anaerolineae) 占 3% 等。该 15 个纲水平细菌约占相应样品总类群的 85.0%。Gammaproteobacteria 纲和 Bacteroidia 纲的相对丰度在 8 个取样位点中均较高, 而 CH 的 Gammaproteobacteria 纲最高丰度超过了 30%, T1L 的 Bacteroidia 纲最高丰度超过了 25%。此外, 8 个取样位点 Deltaproteobacteria 纲的相对丰度也较高(约为 10%)。图 3 显示, 纲水平的一些细菌在 ZnO NPs 浓度处理组中的相对丰度发生了明显变化, 如 Alphaproteobacteria 纲的丰度在添加 ZnO NPs 浓度处理组中明显减小; 而另一些细菌的丰度基本不变, 如 Anaerolineae 纲。不同 ZnO NPs 浓度处理产生了不同的效应, 如在 40 mg/L ZnO NPs 暴露组中 Gammaproteobacteria 纲相对丰度最低。周期淹水区和长期淹水区部分细菌的相对丰度也存在差异, 如 T1H、T2H 和 T3H 中 Deltaproteobacteria 纲相对丰度较高, 而 CH、CL、T1L、T2L 和 T3L 中 Alphaproteobacteria 纲的相对丰度较高。

共检测出 296 个科水平细菌。根据其在每个样本中的丰度信息, 从物种和样本两个层面进行聚类, 见图 4。图 4 为对照组和不同 ZnO NPs 浓度处理组的周期淹水区与长期淹水区微生物群落中相对丰度前 35 的科。随着 ZnO NPs 质量浓度的增加, T1、T2 和 T3 处理组中优势科水平微生物发生变化。对照组 (CH) 中红环菌科 (Rhodocyclaceae)、黄单胞菌科 (Xanthomonadaceae)、硝化螺旋菌科 (Nitrospiraceae) 等 8 个科为优势菌, 在添加了 ZnO NPs 3 个浓度处理组 (T1H、T2H 和 T3H) 后, 这些优势菌的相对丰度均大大减少, T1H、T2H 和 T3H 组中最优势菌依次变为厌氧绳菌科 (Anaerolineaceae)、未分类的蓝藻菌科 (unidentified_Cyanobacteria) 和水马齿科 (Calditrichaceae)。对于长期淹水区来说, 在不同浓度的 ZnO NPs 处理组中, 优势菌也发生了一定的变化, 而这些变化与周期淹水区不同, 优势菌各有不同。可见, ZnO NPs 对周期淹水区与长期淹水区微生物群落的影响不一致。

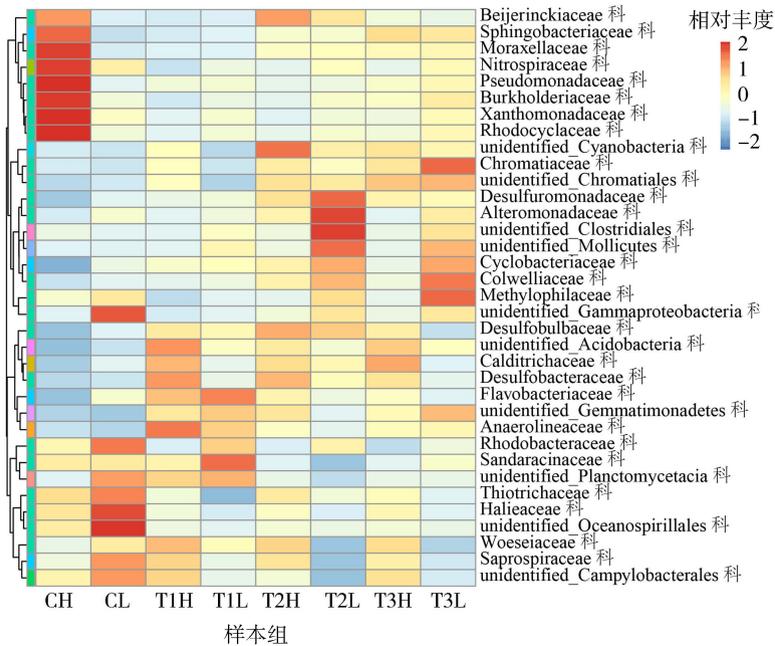


图 4 微生物群落科水平细菌丰度聚类热图

Fig. 4 Heat map of bacteria abundance clustering at family level

2.2 不同质量浓度处理和采样点的微生物群落多样性

β 多样性箱形图 (图 5) 可以直观反映样本组间微生物群落 β 多样性差异。与对照组相比, 在加入 ZnO NPs 后, T2 组的微生物群落 β 多样性受到的影响最大, 而 T1 和 T3 的微生物群落 β 多样性受到的影响均较小。进一步与对照组长期淹水区的微生物多样性指数相比, 加入 ZnO NPs 后, 长期淹水区的微生物多样性指数降低均较为明显, 而周期性淹水区只有 T2H 处理的微生物多样性指数显著降低。

基于 Bray-Curtis 距离矩阵对模拟潮间带微生物样品绘制 NMDS 图 (图 6)。在维度 MDS1 和 MDS2 上得到的应力系数 (stress) 值为 0.153, 该值小于 0.2 说明 NMDS 可以准确反映微生物样本间的差异程度。相近区域内的微生物群落具有相似性, 即相同颜色的样本点距离较近; 而不同颜色的样本点相互分离。对照组的

周期淹水区和长期淹水区微生物样品分布于不同的象限; ZnO NPs 暴露后周期淹水区和长期淹水区微生物样品也基本分布于两个不同的象限,且与对照组距离较大,分别沿 MDS1 和 MDS2 维度方向发生变化;不同暴露浓度的微生物样品距离较近,其中长期淹水区中、高质量浓度(80 mg/L 和 120 mg/L)距离较近,周期淹水区中、低质量浓度距离较近(80 mg/L 和 40 mg/L)。

以暴露浓度和取样位置为基准绘制维恩图(图 7)。由图 7(a)可知,周期淹水区对照组 CH 与 T1H、T2H、T3H 共有 OTUs 个数分别为 2 733、2 745、2 857;由图 7(b)可知,长期淹水区对照组 CL 与 T1L、T2L、T3L 共有 OTUs 个数分别为 2 581、2 638、2 660,可见,周期淹水区添加 ZnO NPs 浓度处理组与对照组共有的 OTUs 个数明显多于长期淹水区添加 ZnO NPs 浓度处理组与对照组共有的 OTUs 个数。

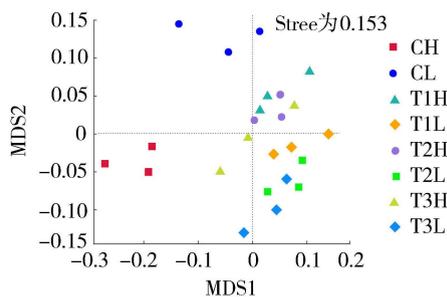


图 6 微生物群落 NMDS 分析
Fig. 6 NMDS analysis of bacterial community

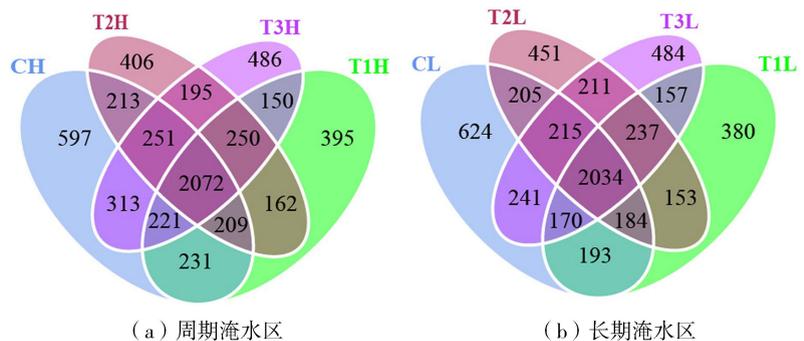


图 7 微生物群落 OTUs 的维恩图
Fig. 7 OTUs Venn diagram of bacterial samples

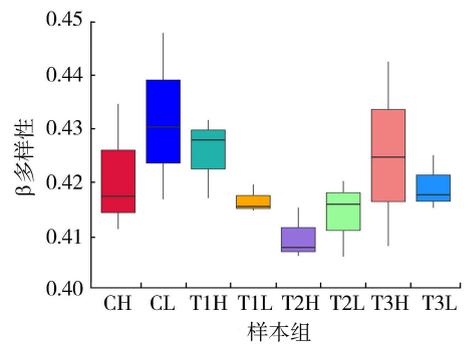


图 5 基于 Unweighted Unifrac 的微生物群落 β 多样性箱形图
Fig. 5 Boxplot of β diversity of bacterial groups based on Unweighted Unifrac

2.3 显著性差异微生物分析

通过 LEfSe 多级物种差异判别比较各组之间丰度差异较大的物种分类。图 8(a)为 CH、T1H、T2H 组间丰度差异显著的微生物,柱状图长度代表 13 个丰度差异显著微生物影响的大小(即 LDA 得分)。若同时考虑 T3H 组,则 4 组微生物的 LDA 均小于 4 而没有统计学差异。通过 LDA 分析估算这些微生物对组间丰度差异影响的大小,CH 组对组间丰度差异影响最大的是 Gammaproteobacteria 纲,其次为未知 γ -变形菌目(unidentified _ Gammaproteobacteria);在 T1H 组中对组间丰度差异影响最大的是黄杆菌科(Flavobacteriaceae),其次为拟杆菌门(Bacteroidetes);T2H 组中对组间丰度差异影响最大的为脱硫杆菌目(Desulfobacterales)。

图 8(b)为 CL、T1L、T2L 和 T3L 组间丰度差异显著的微生物,柱状图长度代表 11 个丰度差异显著微生物影响的大小。在 CL 组中对组间丰度差异影响最大的是 Alphaproteobacteria 纲,其次是红细菌目(Rhodobacterales);在 T1L 组中对组间丰度差异影响最大的是 Bacteroidia 纲,其次为 Flavobacteriaceae 科。T2L 组中对组间丰度差异影响最大的为交替单胞菌目(Alteromonadales);在 T3L 组中对组间丰度差异影响最大的是 Gammaproteobacteria 纲,其次是着色菌目(Chromatiales)。

2.4 沉积物表面 NPs 形貌

图 9 为周期淹水区沉积物颗粒表面的 ZnO NPs 存在形貌。由图 9 可以看出,试验所使用的滨海沉积物表面凹凸不平(图 9(a)),这样的结构一般具有较大的比表面积,利于微生物的富集。与对照组(图 9(a))相比,添加 ZnO NPs 后,微生物表面上沉积了颗粒状物质,由于这些处理组之间只存在 ZnO NPs 质量浓度的差异,故判断沉积物表面微生物上的颗粒状物质为 ZnO NPs。随着 ZnO NPs 质量浓度的增大,ZnO NPs 的聚集状态由稀疏(图 9(b))逐渐变为密集(图 9(c)),可以判断 T3H 样品中出现了较为明显的团聚(图 9(d))。

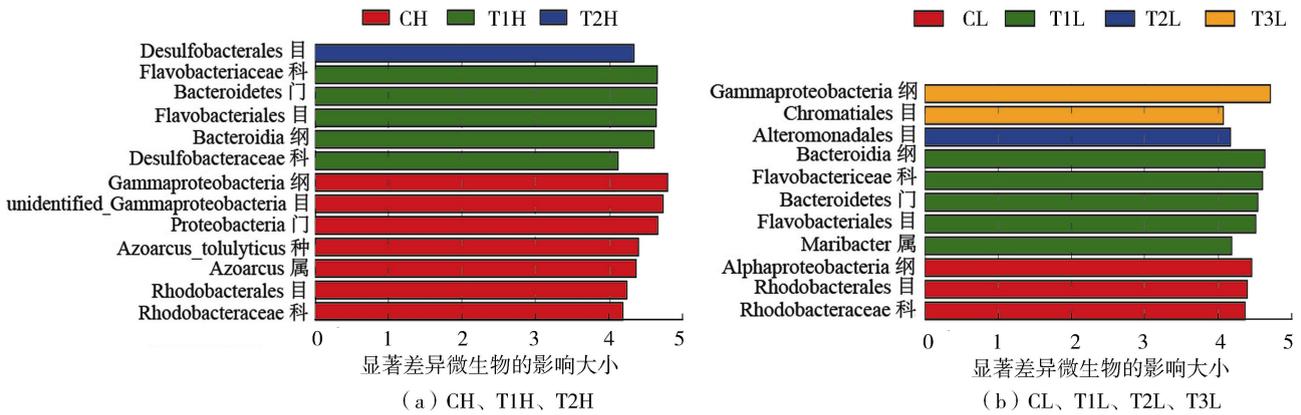


图8 周期淹水区和长期淹水区处理组的 LDA 分布

Fig. 8 LDA score of treatment groups in periodic submerged area and long-term submerged area

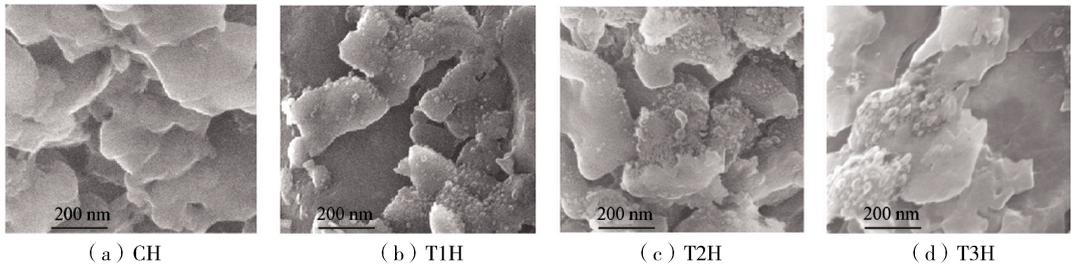


图9 周期淹水区沉积物颗粒表面 ZnO NPs 的存在状态

Fig. 9 Existing status of ZnO NPs on surface of sediment particles in periodic submerged area

3 讨 论

3.1 ZnO NPs 对微生物群落相对丰度的影响

湿地微生物群落受到栖息地多种环境因素的影响,表现出不同的丰度和功能^[17-19]。图3和图4展示了不同质量浓度 ZnO NPs 对滨海湿地微生物的影响,也显示出周期淹水区与长期淹水区微生物群落的差异。一般来说,相似环境条件下中微生物群落具有相似的结构,而在受到毒害物质胁迫后微生物群落结构往往发生改变。已有研究发现 Bacteroidia 纲和 Gammaproteobacteria 纲是海洋环境细菌群落中常见的优势细菌^[20],这与本文的研究结论一致,而在 ZnO NPs 的作用下,这些优势菌表现为丰度的变化而不是完全消失。已有研究发现,在未暴露于 ZnO NPs 的样品中存在更高的细菌丰度^[21]。从本文结果可以看出,ZnO NPs 质量浓度大小的影响是驱动滨海湿地环境中微生物群落相对丰度变化的重要原因。图3和图4显示,对照组中 Gammaproteobacteria 纲以及 Rhodocyclaceae 科的相对丰度高于其他组,说明 ZnO NPs 对该菌有明显的影响。Tayel 等^[22]发现 ZnO NPs 对许多细菌具有广泛的抗菌作用,如对金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)有强烈的破坏作用,且 ZnO NPs 对细菌的这种伤害会随着质量浓度的增加而增加,大肠杆菌(Escherichia coli)仅在低质量浓度 ZnO NPs 中可以存活^[5]。

另一方面,微生物的相对丰度变化也不完全取决于 ZnO NPs 的质量浓度,因为团聚后有效 NPs 粒径的大小也会影响其对细菌的毒性。Zhang 等^[23]研究表明,随着 ZnO NPs 粒径的减小,Escherichia coli 受到的毒性影响增加;Lowry 等^[24]认为,NPs 粒径大小与浓度有关,随着其浓度的增加,有可能发生更大程度的团聚现象,这与图9的结论一致。团聚后的 NPs 颗粒会对某些细菌产生更小的毒性。40 mg/L ZnO NPs 处理中, Gammaproteobacteria 纲在周期淹水区和长期淹水区的相对丰度最低,而在 ZnO NPs 80 mg/L 和 120 mg/L 处理中 Gammaproteobacteria 纲的相对丰度轻微增加,甚至在 120 mg/L 长期淹水区的相对丰度比对照组高,说明 Gammaproteobacteria 纲对 40 mg/L ZnO NPs 暴露更为敏感。T1H、T2H 和 T3H 组中最优势菌依次变为 Anaerolineaceae 科、unidentified_Cyanobacteria 科和 Calditchaceae 科,也说明了 ZnO NPs 质量浓度因素的影响。

此外,细菌自身的结构或代谢特征也会在 NPs 颗粒毒害细菌的反应中起作用,因而某些细菌表现出恒定或增加的相对丰度。Yamamoto^[25]发现,ZnO NPs 对 Staphylococcus aureus 的影响小于对 Escherichia coli 的

影响。Bacteroidia 纲也广泛分布在环境中,其相对丰度变化不大,对 ZnO NPs 不敏感。纲水平结果显示,微生物群落里其他细菌的相对丰度虽然都有波动,但没有表现出明显的规律(图3)。伍玲丽等^[26]认为,NPs 可能是作用于细胞膜产生氧化应激而损伤细菌。因不同细菌的细胞膜不同,故不同细菌种类对 ZnO NPs 表现出不同的耐受性。

周期淹水区和长期淹水区的细菌在相同质量浓度 ZnO NPs 作用下的相对丰度存在差异,这可能是由于周期淹水区和长期淹水区的的环境条件(如 DO、有机质)不同造成的。

3.2 ZnO NPs 对微生物群落多样性和相似性影响

曹晓星等^[27]研究发现,某些海洋微生物具有遗传和生态系统多样性等特点,其强大的防御力和识别力可以让其更好地适应特定环境。本文发现添加 ZnO NPs 后,某些微生物群落 β 多样性发生了较明显的变化(图5),Meli 等^[21,24]亦发现在 NPs 作用下微生物群落 β 多样性发生了改变,大多与 NPs 浓度有关。与对照组相比,添加 ZnO NPs 后微生物群落 β 多样性发生变化,80 mg/L 质量浓度下 β 多样性最低(图5)。这可能是由于大多数菌种对该质量浓度下的 ZnO NPs 比较敏感,而更高的 ZnO NPs 质量浓度(120 mg/L)导致了更严重的 NPs 团聚现象的发生,因此没有表现出对 β 多样性的最大不利影响。He 等^[28]针对序批式反应器的研究发现,ZnO NPs 暴露质量浓度达 20 mg/L 时会明显降低好氧颗粒污泥的微生物多样性。而本文结果表明,滨海湿地环境中菌群的 β 多样性在 40 mg/L 质量浓度条件下也未降低,这可能是由于不同环境条件下微生物群落组成和结构不同造成的。此外,NMDS 结果显示各个处理间微生物样品在距离和沿维度上发生的变化,表明 ZnO NPs 质量浓度不同是驱动微生物群落结构和组成发生变化的重要原因之一。

潮汐作用会对周期淹水区微生物群落造成环境胁迫,好氧和厌氧条件的交替形成了不同的环境条件^[29-30]。这些不同环境因素也会导致相同的 ZnO NPs 质量浓度对周期淹水区和长期淹水区微生物多样性影响的不同。 β 多样性结果显示(图5),长期淹水区的微生物群落多样性对 ZnO NPs 暴露更为敏感,除了在 80 mg/L 质量浓度条件(T2H)下,其降幅均明显大于周期淹水区的微生物群落多样性。NMDS 分析结果表明(图6),ZnO NPs 驱动着微生物群落结构和组成发生变化,但其方向和程度不同,周期淹水区和长期淹水区样品与对照组距离较大,随着 ZnO NPs 质量浓度的增大,分别沿 MDS1 和 MDS2 维度方向发生变化,周期淹水区微生物样品中3个添加 ZnO NPs 浓度处理组的样品并未很好地分开。影响 ZnO NPs 生态效应的环境条件可能是 DO 或碳源等。刘陆^[31]认为潮上带和潮间带的断面条件直接影响微生物群落结构,所以水平分布上表现出相似度较低。Xiao 等^[32]研究表明,微量的 DO 能明显改变微生物群落结构,较高浓度的 DO 可以增加微生物的多样性,但同时抑制了对 DO 较敏感的反硝化细菌的活性。Lei 等^[33]认为,可利用碳源也可造成微生物群落功能的差异,影响微生物群落的活性和功能多样性。 β 多样性和 NMDS 结果均表明,周期淹水区的微生物群落受到的影响比长期淹水区微生物群落小。图7进一步表明,周期淹水区添加 ZnO NPs 浓度处理组与对照组共有 OTUs 个数明显多于长期淹水区添加 ZnO NPs 浓度处理组与对照组共有 OTUs 个数,说明 ZnO NPs 对滨海湿地长期淹水区的微生物群落具有更大的生态风险。

3.3 ZnO NPs 暴露下发生显著改变的微生物

除了 ZnO NPs 质量浓度和环境条件的影响,LEfSe 分析结果证实 ZnO NPs 对生物的影响程度还取决于生物自身的耐受力,这可能与不同细菌的细胞组成结构或代谢途径有关,不同的细菌对 ZnO NPs 可能有着不同的耐受性。金星龙等^[34]研究发现,Escherichia coli 是环境中典型的微生物,对环境毒物尤为敏感,NPs 对其抑菌性与 NPs 浓度呈正相关关系。在淡水环境 50 mg/L ZnO NPs 的暴露下,Bacteroidetes 门丰度无明显变化,而变形杆菌门(Proteobacteria)和蓝细菌门(Cyanobacteria)随着磷浓度的不同表现出了不同的适应性^[10]。在 ZnO NPs 影响下发生显著改变的微生物,如 Gammaproteobacteria 纲中包括的肠杆菌科(Enterobacteriaceae)、弧菌科(Vibrionaceae)和假单胞菌科(Pseudomonadaceae)均为海洋环境中广泛分布的物种;Flavobacteriaceae 科由环境细菌组成,大多数是好氧菌,而有些为微需氧或厌氧^[35];Alphaproteobacteria 纲为革兰氏阴性菌,其包括的微生物占海洋微生物的 10% 左右^[36]。ZnO NPs 易胁迫这些物种发生改变,而这些改变可能引发海洋环境的某些生态风险^[37]。

4 结 论

a. ZnO NPs 质量浓度大小的影响是驱动滨海湿地环境中微生物群落相对丰度、 β 多样性变化的重要原

因之一。随着 ZnO NPs 质量浓度的增加,会产生更大程度的团聚现象,团聚后的 NPs 颗粒降低了对某些细菌的毒性。 β 多样性在 ZnO NPs 80 mg/L 质量浓度下最低。

b. 周期淹水区和长期淹水区不同的环境条件(如 DO、有机质)也会影响 ZnO NPs 对菌群的效应而表现出不同的丰度和多样性。周期淹水区微生物群落受到的影响比长期淹水区微生物群落小,ZnO NPs 对滨海湿地长期淹水区微生物群落具有更大的生态风险。

c. 细菌自身的结构或代谢特征也会在纳米颗粒毒害细菌的反应中起作用,因而某些细菌表现出恒定或增加的相对丰度,具有一定的耐受性。

d. 关键环境因素(如 DO、有机质)对 ZnO NPs 生态效应的影响,以及 ZnO NPs 易胁迫菌群发生改变而可能引发海洋环境的某些生态风险,其相关机制值得今后进一步关注和研究。

参考文献:

- [1] LIU Yaping,ZHU Shuang,GU Zhanjun, et al. Toxicity of manufactured nanomaterials[J]. *Particology*,2022,69:31-48.
- [2] NIU Lihua,ZOU Guanhua,GUO Yuntong, et al. Eutrophication dangers the ecological status of coastal wetlands:a quantitative assessment by composite microbial index of biotic integrity[J]. *Science of the Total Environment*,2021,15:16-20.
- [3] FORERO L A D,FABIANI M,LASSALLE V L, et al. Critical review of the characteristics,interactions,and toxicity of micro/nanomaterials pollutants in aquatic environments[J]. *Marine Pollution Bulletin*,2022,174:113276.
- [4] CHAÛQUE E F C,ZVIMBA J N,NGILA J C, et al. Fate,behaviour,and implications of ZnO nanoparticles in a simulated wastewater treatment plant[J]. *Water SA*,2016,42(1):72-81.
- [5] LI Mei,ZHU Lizhong,LIN Daohui. Toxicity of ZnO nanoparticles to escherichia coli;mechanism and the influence of medium components[J]. *Environmental Science & Technology*,2011,45(5):1977-1983.
- [6] PENG X H,PALMA S,FISHER N S, et al. Effect of morphology of ZnO nanostructures on their toxicity to marine algae[J]. *Aquatic Toxicology*,2011,102(3):186-196.
- [7] BAO Shaopan,XIANG Dongfang,XUE Lu, et al. Pristine and sulfidized ZnO nanoparticles alter microbial community structure and nitrogen cycling in freshwater lakes[J]. *Environmental Pollution*,2022,294:118661.
- [8] 封竞男. 河口水环境中纳米氧化锌对微生物的生态风险及其机制研究[D]. 上海:华东师范大学,2018.
- [9] 王宁,刘丹,谢敏伟,等. 水环境中纳米氧化锌的环境行为及生物毒性研究进展[J]. *环境化学*,2016,35(12):2528-2534. (WANG Ning,LIU Dan,XIE Minwei, et al. Behavior and toxicity of zinc oxide nanoparticles in aquatic environment[J]. *Environmental Chemistry*,2016,35(12):2528-2534. (in Chinese))
- [10] CAI Shujie,WANG Haotian,TANG Jun, et al. Feedback mechanisms of periphytic biofilms to ZnO nanoparticles toxicity at different phosphorus levels[J]. *Journal of Hazardous Materials*,2021,416:125834.
- [11] 王立璇,杨平平. 氧化锌纳米颗粒对污水生物除磷的影响及其机理研究[J]. *环境污染与防治*,2017,39(11):1189-1192. (WANG Lixuan,YANG Pingping. Study on the effect and mechanism of zinc oxide nanoparticles on the biological phosphorus removal from wastewater[J]. *Environmental Pollution & Control*,2017,39(11):1189-1192. (in Chinese))
- [12] 杜京京,崔明会,张玉燕,等. 纳米氧化锌对凋落物降解微生物群落结构和代谢功能的影响[J]. *生态毒理学报*,2018,13(2):149-158. (DU Jingjing,CUI Minghui,ZHANG Yuyan, et al. Impacts of nano-scale ZnO on microbial community composition and degrading activities associated with leaf litter decomposition[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*,2018,13(2):149-158. (in Chinese))
- [13] CHEN Chun,UNRINE J M,HU Yingwei, et al. Responses of soil bacteria and fungal communities to pristine and sulfidized zinc oxide nanoparticles relative to Zn ions[J]. *Journal of Hazardous Materials*,2021,405:124258.
- [14] 李文华,邵学新,吴明,等. 杭州湾生长不同植物的滩涂土壤微生物群落特征[J]. *湿地科学*,2013,11(4):413-420. (LI Wenhua,SHAO Xuexin,WU Ming, et al. Microbial community characteristic of soils with different vegetation in tidal flat in Hangzhou Bay[J]. *Wetland Science*,2013,11(4):413-420. (in Chinese))
- [15] WU Yinghai,HE Tao,CHEN Chen, et al. Impacting microbial communities and absorbing pollutants by *Canna Indica* and *Cyperus Alternifolius* in a full-scale constructed wetland system[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*,2019,16(5):802.
- [16] BATES S T,BERG-LYONS D,CAPORASO J G, et al. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil[J]. *ISME Journal*,2011,5(5):908-917.
- [17] 张松贺,周甜甜,刘远思. 新开河 4 种水生植物表面附着微生物群落特征[J]. *水资源保护*,2020,36(3):83-88. (ZHANG Songhe,ZHOU Tiantian,LIU Yuansi. Characteristics of microbial communities in biofilm of four aquatic macrophytes in Xinkai

- River[J]. *Water Resources Protection*,2020,36(3):83-88. (in Chinese))
- [18] 彭娜,周立志. 基于地理探测器的菜子湖群湿地景观格局变化及驱动因子分析[J]. *水资源保护*,2021,37(6):168-176. (PENG Na,ZHOU Lizhi. Analysis of wetland landscape pattern variation and its driving factors of Caizi Lake group based on geodetector[J]. *Water Resources Protection*,2021,37(6):168-176. (in Chinese))
- [19] 张松贺,袁强,陈洁,等. 硝氮对狐尾藻附着生物膜细菌群落的影响[J]. *河海大学学报(自然科学版)*,2021,49(3):272-278. (ZHANG Songhe,YUAN Qiang,CHEN Jie,et al[J]. *Journal of Hohai University (Natural Sciences)*,2021,49(3):272-278. (in Chinese))
- [20] 董逸. 我国黄、东海典型海域微生物群落结构及其与环境变化的关系[D]. 青岛:中国科学院海洋研究所,2013.
- [21] MELI K,KAMIKA I,KESHRI J, et al. The impact of zinc oxide nanoparticles on the bacterial microbiome of activated sludge systems[J]. *Scientific Reports*,2016,6(1):39176.
- [22] TAYEL A A,EL-TRAS W F,MOUSSA S. Antibacterial action of zinc oxide nanoparticles against foodborne pathogens[J]. *Journal of Food Safety*,2011,31(2):211-218.
- [23] ZHANG Lingling,JIANG Yunhong,DING Yulong, et al. Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids)[J]. *Journal of Nanoparticle Research*,2006,9(3):479-489.
- [24] LOWRY G V,GREGORY K B,APTE S C, et al. Guest comment:transformations of nanomaterials in the environment focus issue [J]. *Environmental Science & Technology*,2012,46(13):6891-6892.
- [25] YAMAMOTO O. Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide [J]. *International Journal of Inorganic Materials*,2011,3(7):643-646.
- [26] 伍玲丽,张晓雪,舒昆慧,等. 两种粒径纳米银对 *Nitrosomonas europaea* 的毒性效应[J]. *中国环境科学*,2019,39(10):4401-4408. (WU Lingli,ZHANG Xiaoxue,SHU Kunhui, et al. Toxicity of two sizes of silver nanoparticles to *Nitrosomonas europaea*[J]. *China Environmental Science*,2019,39(10):4401-4408. (in Chinese))
- [27] 曹晓星,苏建强,郑天凌,等. 海洋微生物的多样性在赤潮调控中的利用[J]. *海洋科学*,2007,31(5):63-69. (CAO Xiaoxing,SU Jianqiang,ZHENG Tianling, et al. Marine microbial diversities and its application in red-tide control[J]. *Marine Sciences*,2007,31(5):63-69. (in Chinese))
- [28] HE Qiulai,GAO Shuxian,ZHANG Shilu, et al. Chronic responses of aerobic granules to zinc oxide nanoparticles in a sequencing batch reactor performing simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal [J]. *Bioresource Technology*,2017,238:95-101.
- [29] LYU Xiaofei,MA Bin,YU Junbao, et al. Bacterial community structure and function shift along a successional series of tidal flats in the Yellow River Delta[J]. *Scientific Reports*,2016,6(1):36550.
- [30] 李轶,雷梦婷,杨楠,等. 河流微生物生态学的研究进展[J]. *水资源保护*,2022,38(1):190-197. (LI Yi,LEI Mengting, YANG Nan, et al. Research and prospect on river microbial ecology[J]. *Water Resources Protection*,2022,38(1):190-197. (in Chinese))
- [31] 刘陆. 黄河口潮间带泥滩环境微生物群落特征研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2014.
- [32] XIAO Pengying,ZHOU Jing,LUO Xiaojing, et al. Enhanced nitrogen removal from high-strength ammonium wastewater by improving heterotrophic nitrification-aerobic denitrification process:insight into the influence of dissolved oxygen in the outer layer of the biofilm[J]. *Journal of Cleaner Production*,2021,297:126658.
- [33] LEI Jiang,ZHANG Yifang,SHEN Qiushi, et al. The metabolic patterns of the complete nitrates removal in the biofilm denitrification systems supported by polymer and water-soluble carbon sources as the electron donors [J]. *Bioresource Technology*,2021,342:126002.
- [34] 金星龙,覃春丽,李晓,等. 纳米材料的微生物效应研究进展[J]. *天津理工大学学报*,2011,27(5):73-78. (JIN Xinglong, QIN Chunli, LI Xiao, et al. Research progress on microbial effects of nanomaterials [J]. *Journal of Tianjin University of Technology*,2011,27(5):73-78. (in Chinese))
- [35] BERNARDET J F,NAKAGAWA Y. An introduction to the family flavobacteriaceae[J]. *The Prokaryotes*,2006,7:455-480.
- [36] RODRÍGUEZ-EZPELETA N,EMBLEY T M. The SAR11 group of alpha-proteobacteria is not related to the origin of mitochondria [J]. *PLoS ONE*,2012,7(1):e30520.
- [37] 张凤臣,程沁灵,许鹏,等. 培养基对海洋微生物在水泥石表面附着的影响[J]. *河海大学学报(自然科学版)*,2018,46(2):171-176. (ZHANG Fengchen, CHENG Qinling, XU Peng, et al. Marine microbe adhesion on hardened cement paste surface in different culture medium[J]. *Journal of Hohai University (Natural Sciences)*,2018,46(2):171-176. (in Chinese))