

纳米氧化锌和菲对长江口附近海域沉积物反硝化作用及功能菌群落结构的影响^{*}

任朝萌¹, 白洁^{1,2}, 李辉^{1,2}, 孙鹏飞^{1,3}, 晨曦^{4**}

(1. 中国海洋大学环境科学与工程学院, 山东 青岛 266100; 2. 中国海洋大学海洋环境与生态教育部重点实验室, 山东 青岛 266100;
3. 自然资源部第四海洋研究所, 广西 北海 536000; 4. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 本研究在长江口附近海域采集表层沉积物,采用实验室模拟培养与分子生物学手段相结合的方法,通过测定纳米氧化锌(ZnO NPs)和菲(Phe)胁迫下沉积物中 NO_3^- -N和 NO_2^- -N浓度和反硝化还原酶活性及反硝化细菌基因丰度和群落多样性变化,目的是比较研究ZnO NPs和Phe对河口区沉积物反硝化作用及功能菌群落结构的影响,并探讨其作用过程和可能的作用机制。结果表明:ZnO NPs和Phe对沉积物硝酸盐还原能力和亚硝酸盐还原能力均产生抑制作用,浓度越高,抑制作用越强,其中亚硝酸盐还原过程受到2种污染物抑制更强烈,加重了沉积物亚硝酸盐的累积。ZnO NPs对沉积物硝酸盐还原能力、硝酸还原酶活性、*narG*基因丰度的抑制程度大于Phe,Phe对沉积物亚硝酸盐还原能力、亚硝酸盐还原酶和*nirS*基因丰度的抑制程度大于ZnO NPs,表明对反硝化还原酶和反硝化功能基因的抑制是外源污染物胁迫影响反硝化过程的主要机制。ZnO NPs和Phe降低了沉积物反硝化菌群落多样性水平,增加沉积物中*Halomonas*的优势度,降低了*Bacillus*的优势度,但Phe对沉积物群落多样性和组成的影响更加明显,说明Phe对长江口海区的生态影响大于ZnO-NPs。

关键词: 纳米氧化锌; 菲; 反硝化作用; 反硝化还原酶; 基因丰度; 群落多样性

中图分类号: P734.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-5174(2021)06-078-10

DOI: 10.16441/j.cnki.hdxh.20200134

引用格式: 任朝萌,白洁,李辉,等. 纳米氧化锌和菲对长江口附近海域沉积物反硝化作用及功能菌群落结构的影响[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2021, 51(6): 78-87.

REN Zhao-Meng, BAI Jie, LI Hui, et al. Effects of zinc oxide nanoparticles and phenanthrene on denitrification and denitrifying bacteria communities of sediments in the sea area near the Yangtze River Estuary[J]. Periodical of Ocean University of China, 2021, 51(6): 78-87.

河口区是陆地和海洋生态系统重要的氮汇,河口沉积物的反硝化作用在缓解近海富营养化和改善海洋系统氮负荷方面起着至关重要的作用,也是外源污染物对反硝化细菌群落多样性和生态功能影响的敏感区^[1]。长江口沿岸居住人口密度大,近年来工业化快速发展,大量生产、生活废物排入长江口,导致其生态环境问题严重^[2]。长江口及邻近海域中污染物种类复杂,大多数研究集中于传统有机污染物如多氯联苯、多环芳烃等,有调查表明长江口表层沉积物中多环芳烃浓度处于中低等污染水平^[3];近年来新出现的药物或化工产品带来了相关的新型污染如抗生素、纳米材料等也在长江口海区被发现,并越来越受到人们的重视^[4],多环芳烃不易降解,金属纳米材料更难在环境中去除,最终沉降到表层沉积物中,单独或复合影响沉积

环境的生态健康。戴朝霞等^[5]通过研究发现多壁碳纳米管和纳米氧化锌与菲复合作用可诱导鲫鱼脑部和肝脏组织汇总自由基的生成,使菲在鱼脑、眼等部位富集增加;Schwab^[6]研究发现碳纳米管吸附有机污染物敌草隆,与小球藻接触后,局部暴露浓度增大、毒性作用增强。纳米氧化锌(ZnO NPs)作为最常见的纳米材料之一,广泛应用于涂料、橡胶、化妆品等领域^[7],在生产、生活中的大量使用不可避免地会被释放到淡水、河口和海洋环境中,经过聚集、溶解、络合、转化和沉降等一系列过程,最终沉积到沉积物中,对自然水体及沉积物生态系统造成潜在风险^[8]。菲(Phe)是一种具有“致癌、致畸、致基因突变”作用的多环芳烃类有机污染物^[9],在环境中来源广泛,可通过化石燃料的不完全燃烧、森林火灾、火山喷发、生物的内源性合成等途径生

^{*} 基金项目:国家重点研究发展计划项目(2018YFC1407601);青岛市博士后应用研究项目资助

Supported by the National Key Research and Development Plan(2018YFC1407601);the Postdoctoral Applied Research Project of Qingdao

收稿日期:2020-04-28;修订日期:2020-05-21

作者简介:任朝萌(1995-),男,硕士生。E-mail:961093943@qq.com

^{**} 通讯作者:E-mail:chenxi@ouc.edu.cn

成^[10],其在水环境中溶解度小,易沉降在沉积物中,最终对沉积物生态系统构成损害^[11]。

反硝化作用是氮循环的关键过程,由多种异养反硝化细菌驱动^[12-13],反硝化细菌利用碳底物作为电子供体,将 NO_3^- 逐步还原为 NO_2^- 、 NO 、 N_2O 和 N_2 ,在此还原过程中对应的催化还原酶(基因)分别为硝酸盐还原酶(Nar)、亚硝酸盐还原酶(Nir)、一氧化氮还原酶(Nor)和氧化亚氮还原酶(Nos)^[14]。反硝化作用的进行很大程度上取决于微生物种群特征和酶活性,环境中相关的物理和化学因素都会对其产生显著影响,如温度、pH、有机碳底物等,以及影响微生物活性的有毒化合物(如纳米颗粒、多环芳烃等)^[15-16]。有研究表明,纳米材料可通过改变微生物群落结构、降低反硝化功能基因(如 *nirK*、*nirS*)丰度和降低微生物酶活性来影响反硝化作用^[17],而反硝化细菌的功能可通过编码关键反硝化酶的功能基因进行量化^[14]。

本研究分别以典型的多环芳烃类 Phe 和纳米材料 ZnO NPs 作为传统难降解有机污染物和新型无机污染物的代表,在长江口附近海区采集表层沉积物样品,在实验室进行 ZnO NPs 和 Phe 胁迫下的现场模拟培养实验,比较研究了不同浓度 ZnO NPs 和 Phe 对沉积物反硝化能力、反硝化还原酶活性以及沉积物反硝化细菌基因丰度和群落结构的影响,探讨了其关键作用过程和主要机制,以期为深入研究多环芳烃和纳米材料对河口区沉积系统的生态影响及作用机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 纳米氧化锌和菲的预处理

本研究使用的 ZnO NPs 购自 SIGMA-ALDRICH®,粒径 $<50\text{ nm}$,纯度 $>97\%$ 。纳米氧化锌溶液易发生团聚效应,需要现用现配,在冰浴条件下进行超声波处理(40 kHz 和 250 W)1 h。

所用的 Phe 购于 SIGMA-ALDRICH®,纯度为 98%。不同浓度 Phe 污染沉积物样的配制方法:将 Phe 溶于少许体积的丙酮并加入到过筛沉积物样中,搅拌均匀后放入超净工作台中,待丙酮挥发干净后使用。

1.2 现场样品采集及预处理

于 2018 年 10 月,在长江口 C 站(124.0010°E, 30.5990°N)采集表层(0~5 cm)沉积物样,采样站位如图 1。将所采集沉积物样装入提前准备的无菌塑料袋中,排除空气后密封;同时采集现场沉积物上覆海水,立即注入聚乙烯塑料瓶中。现场采集的所有样品冷藏保存并及时开展实验。

所采集沉积物样品在实验前充分混匀,过 1 mm 标准筛网后使用;沉积物上覆海水经 0.22 μm 醋酸纤维滤膜过滤后使用。

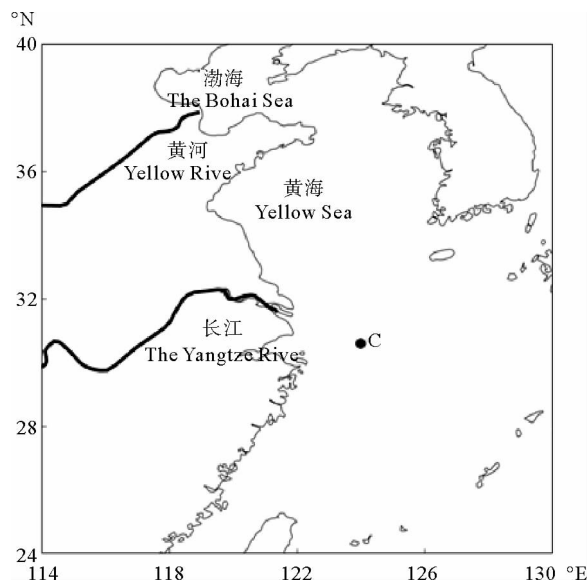


图 1 采样站示意图

Fig.1 Sampling station

1.3 纳米氧化锌和菲胁迫培养实验

培养实验设置对照组(不含污染物的 C 组)、低浓度 ZnO NPs 胁迫组(LZ 组,170 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ZnO NPs)、高浓度 ZnO NPs 胁迫组(HZ 组,1 700 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ZnO NPs)、低浓度 Phe 胁迫组(LP 组,50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Phe'),高浓度 Phe 胁迫组(HP 组,500 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Phe'),其中各胁迫实验组的污染物浓度分别参照 ZnO NPs 和 Phe 对反硝化作用的半抑制效应浓度设置。在采集的现场海水中加入 1‰ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 和 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KNO_3 作为培养液,每个培养瓶中装入 60 g 沉积物和 60 mL 上述培养液,通氮气除氧 15 min 后密封培养瓶,在 80 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的恒温振荡培养箱中 28 °C 避光培养 14 d。每组实验设 3 个平行实验组。

1.4 培养过程中的样品采集

分别于培养的 0、1、3、7、14 d 取各培养体系的泥水混合液样品,立即进行 NO_3^- 、 NO_2^- 浓度和 NO_3^- 、 NO_2^- 还原酶活性的测定;于第 7 天取各组泥水样品测定其反硝化菌基因丰度,并同时测定 C 组、HZ 组和 HP 组样品的反硝化菌群落结构和多样性。

1.5 样品处理与测定

NO_3^- -N、 NO_2^- -N 浓度:取 10 mL 混合液样品于离心管中,离心(5 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min)后取上清液过 0.22 μm 滤膜,采用 Cd 柱还原法^[18]测量其浓度,所用仪器为 QuAatro 营养盐分析仪。

NO_3^- 、 NO_2^- 还原酶活性:取 5 mL 混合液样品,离心(8 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min)后倒去上清液,用 100 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸钾缓冲液(pH = 7.4)洗涤 3 次倒去上清液以去除样品中的硝酸盐残留,在沉积物中加入缓冲液后超声(4 °C, 20 kHz)5 min 以破碎细胞结构,离心

(12 000 r · min⁻¹, 10 min)后取上清液于厌氧气相瓶中,加入酶活培养液后通氮气 15 min 使其处于厌氧环境,最后于恒温培养箱中 30 °C 培养 30 min,根据 NO₃⁻ 和 NO₂⁻ 的消耗量分别计算 NO₃⁻ 和 NO₂⁻ 还原酶的酶活性^[19]。酶活培养液含有:100 mmol · L⁻¹ 磷酸盐缓冲溶液、1 mmol · L⁻¹ NaNO₃/NaNO₂、1 mmol · L⁻¹ 甲基紫精 5 mmol · L⁻¹ Na₂S₂O₄。

1.6 分子生物学分析

1.6.1 总 DNA 提取 沉积物样品总 DNA 提取,使用 Mag-Bind Soil DNA Kit(200)(Omega Bio-Tek)试剂盒提取总 DNA。提取的总 DNA 经 Nanodrop(Thermo Scientific)检测核酸浓度和纯度后,于-80 °C 保存,用于后续分子生物学测定。

1.6.2 功能基因 *narG* 和 *nirS* 丰度的测定 功能基因的定量测量采用 SYBR GREEN 法,用荧光定量 PCR 测定。将经普通 PCR 扩增的含有目的基因 *narG* 和 *nirS* 的条带分别进行克隆,提取质粒 DNA,并进行 10 倍浓度梯度稀释,构建标准曲线。以提取沉积物样品的总 DNA 为模板,对反硝化功能基因 *narG* 和 *nirS* 进行荧光定量分析。*narG* 基因引物对:*narG*-1960m2f/*narG*-2050m2r^[20]; *nirS* 基因引物对:Cd3aF/

R3cd^[21];PCR 扩增程序:95 °C 5 min,95 °C 15 s,60 °C 30 s,40 个循环;PCR 扩增体系:16 μL 体系,包含 8 μL mixture A 体系(2 × SYBR real-time PCR premixture 10 μL,10 μmol/L 的上、下游引物各 0.4 μL)、8 μL DNA 模板稀释样。

1.6.3 反硝化细菌群落结构和多样性分析 取培养至第 7 天的对照组、高浓度 ZnO NPs 组和高浓度菲组的沉积物样品送往派森诺生物基因测序公司进行测序分析微生物群落多样性,群落结构采用 QIIME 软件划分操作分类单元(OTU),并通过计算 Shannon 指数^[22]和 Simpson 指数^[23]和覆盖度来进行 Alpha 多样性分析。

1.7 数据分析

数据作图用 origin9.2 完成,统计分析通过 spss19.0 软件完成,差异显著性检验采用单因素方差分析法($P < 0.05$ 为差异显著)。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 ZnO NPs 和 Phe 对长江口沉积物硝酸盐还原能力的影响

图 2 为沉积物分别在 ZnO NPs 和 Phe 胁迫下培养 14 d 时硝酸盐浓度的变化。

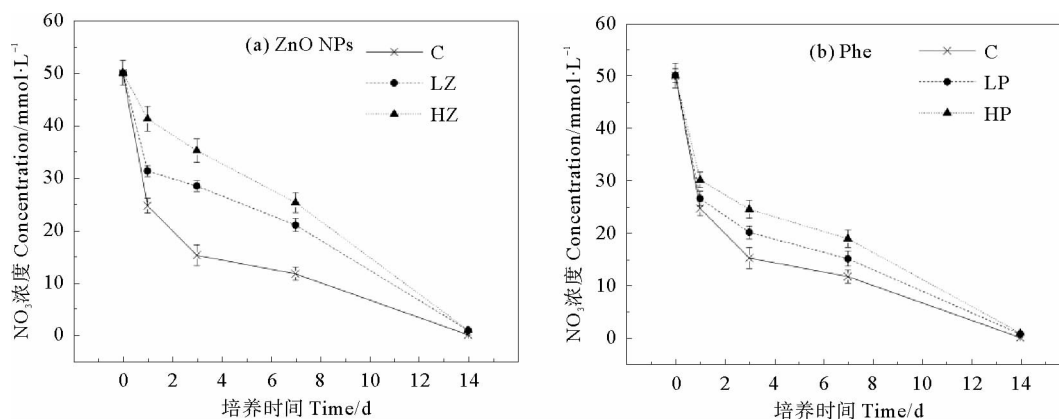


图 2 不同浓度 ZnO NPs 和 Phe 胁迫下 NO₃⁻ 浓度的变化

Fig.2 Variation of NO₃⁻ concentration among different ZnO NPs and Phe concentrations

如图 2(a)所示,低、高浓度 ZnO NPs 组硝酸盐浓度在培养过程中显著高于对照组,说明沉积物中的硝酸盐还原受到了 ZnO NPs 的抑制;低浓度 ZnO NPs 组硝酸盐还原量在第 1、3、7 和 14 天分别为对照组的 73.95%、62.09%、75.73%、98.23%,高浓度 ZnO NPs 组分别为对照组的 34.67%、42.64%、64.57%、98.22%,低、高浓度 ZnO NPs 组硝酸盐还原能力分别第 3 天和第 1 天受到 ZnO NPs 抑制最明显,随后逐渐恢复。如图 2(b)所示,低、高浓度 Phe 组硝酸盐浓度在培养过程中高于对照组,说明沉积物中的硝酸盐还

原过程受到了 Phe 的抑制;低浓度 Phe 组硝酸盐还原量在第 1、3、7 和 14 天分别为对照组的 92.58%、85.95%、91.16%、98.63%,高浓度 Phe 组高浓度组分别为对照组的 78.57%、73.28%、81.16%、98.23%,说明低、高浓度 Phe 组硝酸盐还原能力在第 3 天受到的抑制最明显,随后逐渐恢复。由此可见,ZnO NPs 和 Phe 会对沉积物硝酸盐还原能力产生抑制作用,随污染物浓度的增加抑制作用越强,且 ZnO NPs 对硝酸盐还原能力的抑制程度大于 Phe。

2.2 不同浓度 ZnO NPs 和 Phe 对长江口沉积物亚硝酸盐累积的影响

图 3 为沉积物分别在 ZnO NPs 和 Phe 胁迫下培

养 14 d 时亚硝酸盐浓度的变化情况。各组沉积物在培养过程中均出现了不同程度的亚硝酸盐累积情况。

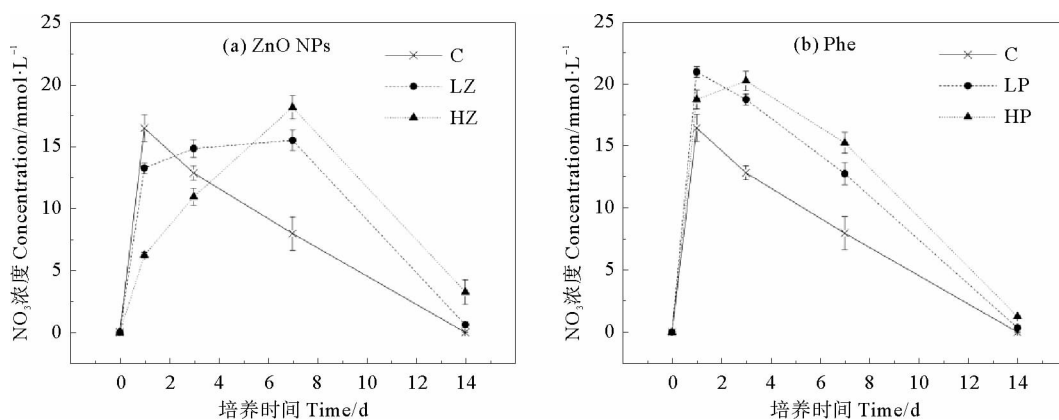


图 3 不同浓度 ZnO NPs 和 Phe 胁迫下 NO_2^- 浓度的变化

Fig.3 Variation of NO_3^- concentration among different ZnO NPs and Phe concentrations

从图 3(a)可以看出,低、高浓度 ZnO NPs 组亚硝酸盐浓度在 7~14 d 显著高于对照组,说明 ZnO NPs 导致沉积物在培养的中后期亚硝酸盐累积更加严重;低浓度 ZnO NPs 组亚硝酸盐还原量在第 1、3、7 和 14 天分别为对照组的 61.92%、30.94%、44.62%、97.00%,高浓度 ZnO NPs 组分别为对照组的 28.81%、17.82%、21.80%、91.72%,低、高浓度 ZnO NPs 组亚硝酸盐还原能力在第 3 天受到 ZnO NPs 抑制最明显,随后还原能力逐渐恢复。从图 3(b)可以看出,低、高浓度 Phe 组亚硝酸盐浓度在第 1 天后就显著高于对照组,说明 Phe 导致沉积物几乎在整个培养过程中亚硝酸盐累积更加严重;低浓度 Phe 组亚硝酸盐

还原量在第 1、3、7 和 14 天分别为对照组的 28.12%、50.79%、73.03%、97.95%,高浓度 Phe 组分别为对照组的 13.08%、23.98%、52.20%、95.70%,低、高浓度 Phe 组亚硝酸盐还原能力在第 1 天受到 Phe 的抑制最为明显,随后逐渐恢复。可见,ZnO NPs 和 Phe 会对沉积物亚硝酸盐还原能力产生抑制作用,浓度越高,抑制作用越强,导致沉积物中亚硝酸盐累积更严重,且 Phe 对沉积物亚硝酸盐还原能力的抑制程度较 ZnO NPs 的更大。

2.3 不同浓度 ZnO NPs 和 Phe 对长江口沉积物硝酸盐还原酶活性的影响

图 4 是在 ZnO NPs 和 Phe 胁迫下培养 14 d 时沉积物硝酸还原酶活性的变化情况。

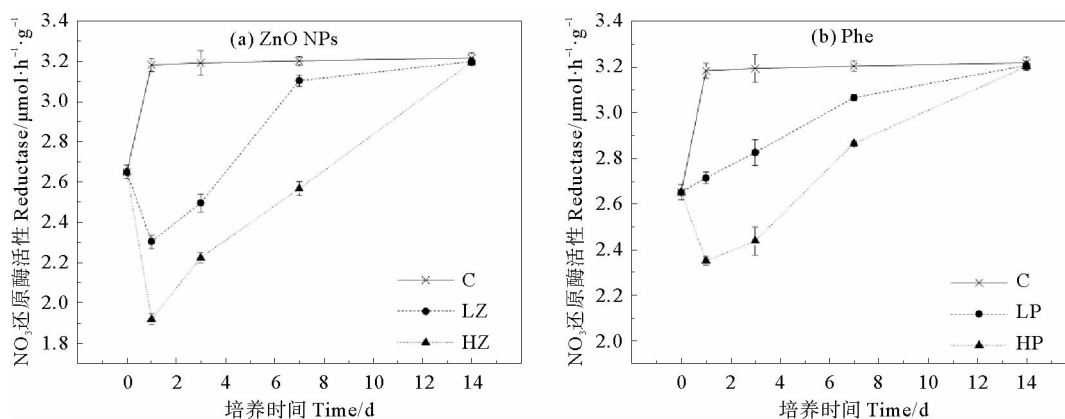


图 4 不同浓度 ZnO NPs 和 Phe 胁迫下 NO_3^- 还原酶活性的变化

Fig.4 Variation of NO_3^- reductase among different ZnO NPs and Phe concentrations

如图 4(a)所示,在整个培养过程中,低、高浓度 ZnO NPs 组硝酸还原酶活性显著高于对照组,其中低浓度 ZnO NPs 组沉积物硝酸还原酶活性在第 1、3、7 和 14 天分别为对照组的 72.41%、78.20%、96.92%、

99.46%,高浓度 ZnO NPs 组分别为对照组的 60.28%、69.68%、80.19%、99.35%,说明低、高浓度 ZnO NPs 组沉积物硝酸还原酶活性在第 1 天受到 ZnO NPs 的抑制最明显,随后在 2~14 d 逐渐恢复。在图 4(b)中,

低、高浓度 Phe 组硝酸还原酶活性在培养过程中同样显著高于对照组,其中低浓度 Phe 组沉积物硝酸还原酶活性在第 1、3、7 和 14 天分别为对照组的 85.26%、88.48%、95.69%、99.64%,高浓度 Phe 组分别为对照组的 86.62%、86.30%、93.47%、99.85%,可以看出,低、高浓度 Phe 组沉积物硝酸还原酶活性同 ZnO NPs 胁迫组相似,在第 1 天受到 Phe 的抑制最明显,随后逐

渐恢复。由此可见,ZnO NPs 和 Phe 均会抑制沉积物硝酸还原酶活性,浓度越高,抑制效应越强,且 ZnO NPs 对沉积物硝酸还原酶活性的抑制程度明显大于 Phe。

2.4 不同浓度 ZnO NPs 和 Phe 对长江口沉积物亚硝酸盐还原酶活性的影响

图 5 是在 ZnO NPs 和 Phe 胁迫下培养 14 d 时沉积物亚硝酸还原酶活性的变化情况。

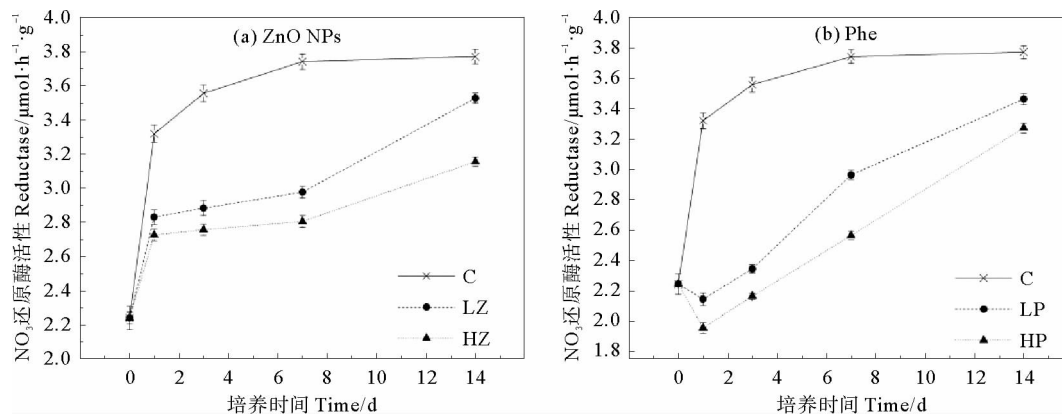


图 5 不同浓度 ZnO NPs 和 Phe 胁迫下 NO_2^- 还原酶活性的变化

Fig.5 Variation of NO_2^- reductase among different ZnO NPs and Phe concentrations

由图可见,各组沉积物亚硝酸还原酶活性也均表现为高浓度组<低浓度组<对照组,说明沉积物亚硝酸还原酶活性受到两种污染物的显著抑制。ZnO NPs 胁迫下亚硝酸还原酶活性变化如图 5(a)所示,各组沉积物均表现为逐渐上升的趋势,但低、高 ZnO NPs 浓度组上升趋势明显小于对照组,在第 1、3、7 和 14 天,低浓度 ZnO NPs 组沉积物亚硝酸还原酶活性分别为对照组的 85.28%、81.10%、79.56%、93.54%,高浓度 ZnO NPs 组分别为对照组的 82.14%、77.53%、74.98%、83.68%,低、高浓度 ZnO NPs 组沉积物亚硝酸还原酶活性在第 1~7 天受到 ZnO NPs 的抑制逐渐增强,随后酶活有所恢复;Phe 胁迫下不同组亚硝酸还原酶活性变化如图 5(b)所示,对照组亚硝酸还原酶活性表现为逐渐上升的趋势,低、高浓度组亚硝酸还原酶

活性则表现为先下降后上升的趋势,低浓度 Phe 组沉积物亚硝酸还原酶活性在第 1、3、7 和 14 天分别为对照组的 64.49%、65.82%、79.14%、89.12%,高浓度 Phe 组分别为对照组的 58.77%、60.76%、68.44%、86.74%,低、高浓度 Phe 组沉积物亚硝酸还原酶活性在第 1 天就收到了强烈的抑制,随后逐渐恢复。可见,ZnO NPs 和 Phe 均会抑制沉积物亚硝酸还原酶活性,浓度越高,抑制效应越强,且 Phe 对沉积物亚硝酸还原酶活性的抑制程度明显大于 ZnO NPs。

2.5 ZnO NPs 和 Phe 对长江口沉积物 *narG* 和 *nirS* 基因丰度的影响

图 6(a)和图 6(b)分别是在不同浓度 ZnO NPs 和 Phe 分别胁迫下培养第 7 天沉积物中 *narG* 和 *nirS* 的基因丰度结果。

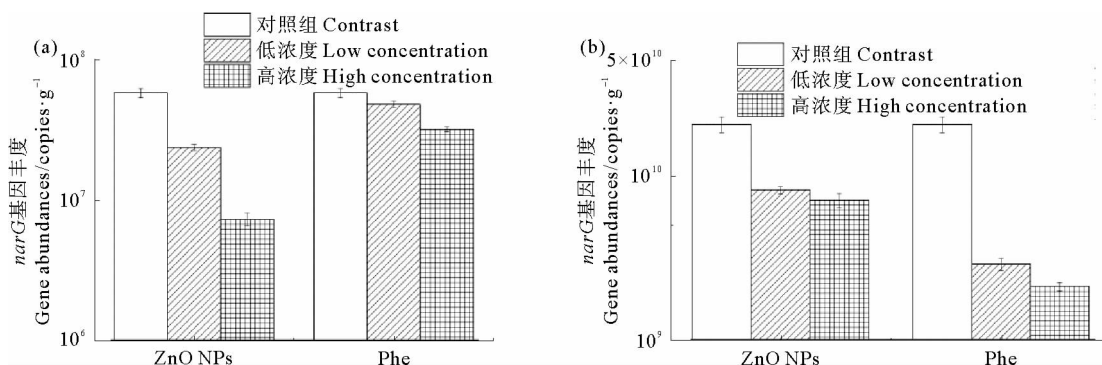


图 6 第 7 天 ZnO NPs 和 Phe 实验组沉积物中 *narG*(a)和 *nirS*(b)的基因丰度

Fig.6 Gene abundances of *narG*(a)and *nirS*(b)genes in sediments of ZnO NPs and Phe experimental groups on the 7th day

从图 6(a)可以看出,对照组、低、高浓度 ZnO NPs 组沉积物在第 7 天 *narG* 基因丰度分别为 5.74×10^7 、 2.35×10^7 和 7.25×10^6 copies $\cdot$ g $^{-1}$,低、高浓度 ZnO-NPs 组分别是对照组的 40.88%、12.64%;低、高浓度 Phe 组沉积物在第 7 天 *narG* 基因丰度分别为对照组的 83.15%、54.94%,表明沉积物中 *narG* 基因丰度明显受到 ZnO NPs 和 Phe 的抑制,且受 ZnO NPs 抑制程度更大。从图 6(b)可以看出,对照组、低、高浓度 ZnO NPs 组在第 7 天 *nirS* 基因丰度分别 2.03×10^{10} copies $\cdot$ g $^{-1}$ 、 8.11×10^9 copies $\cdot$ g $^{-1}$ 、 7.03×10^9 copies $\cdot$ g $^{-1}$,低、高浓度 ZnO NPs 组 *nirS* 基因丰度分别为对照组的 39.86%、34.56%;低、高浓度 Phe 组沉积物在第 7 天 *nirS* 基因丰度分别为对照组的 14.13%、10.34%,可见沉积物中 *nirS* 基因丰度同样受到 ZnO NPs 和 Phe 的抑制,且受 Phe 抑制更明显。由此可以看出, ZnO NPs 和 Phe 会抑制沉积物中 *narG* 和 *nirS* 的基因丰度,浓度越高,抑制效应越强,且 ZnO NPs 对 *narG* 基因丰度的抑制程度大于 Phe,而 Phe 对 *nirS* 基因丰度的抑制程度大于 ZnO NPs。

2.6 ZnO NPs 和 Phe 对反硝化功能菌的影响

2.6.1 ZnO NPs 和 Phe 对反硝化菌群多样性的影响

通过 Illumina MiSeq 测序平台对添加 2 种污染物

沉积物的 *nirS* 基因代表的反硝化菌进行种群多样性分析,结果见表 1。3 组沉积物的反硝化菌覆盖度均大于 99%。2 个污染物高浓度胁迫组 HZ、HP 中沉积物 simpson 指数和 shannon 指数均小于对照组,表明这 2 个实验组反硝化菌群多样性水平低于对照组,可见 ZnO NPs 和 Phe 均对沉积物反硝化菌群多样性水平产生一定的抑制作用,且 Phe 的抑制作用更加明显。

表 1 不同组反硝化菌的群落多样性指数

Table 1 Microbial diversity index of different samples

组别 Groups	覆盖度 Coverage	Simpson	Shannon
C	0.999 897	0.702 435	2.845 652
HZ	0.999 929	0.592 859	2.279 15
HP	0.999 892	0.591 858	2.143 66

2.6.2 ZnO NPs 和 Phe 对反硝化菌群落结构的影响

图 7 是纳米氧化锌和非胁迫下反硝化菌群落结构的变化情况。

图 7(a)是 ZnO NPs、Phe 胁迫组和对照组沉积物中反硝化菌群落组成在门水平上的变化情况。图中显示 3 组沉积物 *nirS* 基因门水平序列按占比从大到小主

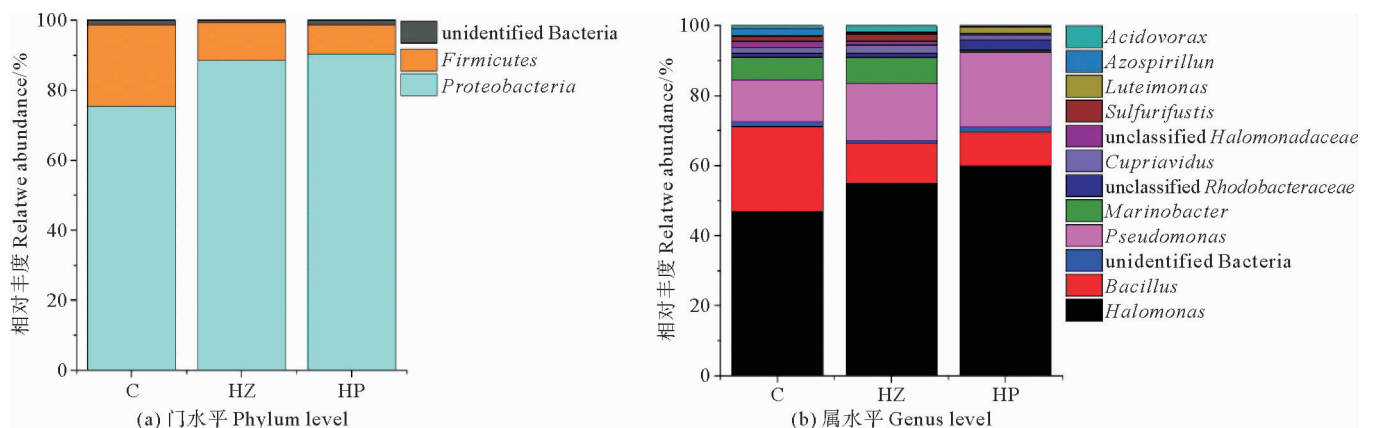


图 7 纳米氧化锌和非胁迫下反硝化菌群落结构的变化

Fig.7 Distributions of denitrification bacterial communities under the stress of ZnO NPs or Phe (A) at phylum and (B)at genus levels

要被注释为变形菌门、厚壁菌门和未被分类的细菌。与对照组相比,在添加 ZnO NPs 后沉积物中变形菌门占比由 75.37% 增加至 88.53%,厚壁菌门占比由 23.35% 减少至 10.86%; Phe 添加后沉积物中变形菌门占比由 75.37% 增加至 90.35%,厚壁菌门占比由 23.35% 减少至 8.37%。

图 7(b)为 3 组沉积物反硝化菌在属水平上的变化,各组占比最多的 4 种菌属为 *Halomonas*、*Bacillus*、unidentified Bacteria 和 *Pseudomonas*。与对照组相比, ZnO NPs 组 *Halomonas* 占比由 45.13% 增加至

51.97%,*Bacillus* 占比由 23.35% 降低至 10.86%; Phe 添加组 *Halomonas* 占比由 45.13% 增加至 52.07%,*Bacillus* 占比由 23.35% 降低至 8.37%。

3 讨论

3.1 ZnO NPs 和 Phe 对反硝化作用的影响及生态效应

反硝化作用是在厌氧或低氧条件下反硝化微生物将 NO_3^- 最终转化为 N_2 的过程,被认为是环境中氮永久去除的重要过程之一^[24]。而 NO_3^- 转化为 NO_2^- 和 NO_2^- 转化为 NO 是反硝化作用中的两个关键过程。

本研究中 ZnO NPs 和 Phe 胁迫均对研究海区沉积物硝酸盐和亚硝酸盐还原能力产生了显著抑制,尤其是 ZnO NPs 对亚硝酸盐还原能力的抑制作用更为强烈,会导致沉积物中硝态氮的去除率降低和更严重的亚硝酸盐累积,影响环境中的氮循环。这与目前许多关于污染物对反硝化作用的影响研究结果相似,如吴伟恒等^[25]研究发现雌激素污染对水体微生物反硝化过程有显著的抑制作用,影响水体中的氮循环;赵迪^[26]研究发现重金属对潮滩沉积物反硝化作用具有显著的抑制效应。

许多研究表明,环境中亚硝酸盐的累积会导致动植物的损伤^[27]。在水环境中,亚硝酸盐浓度过高时造成一些水生动物体内血浆中亚硝酸盐的聚集,亚硝酸盐能够将水生动物体内的血红素或血蓝质转化为高铁血红蛋白和高铁血清素,从而降低其输氧能力,构成损害;此外还会通过影响细胞膜的质子通透性和叶绿体来抑制植物的生长^[28]。因此,ZnO NPs 抑制反硝化作用所造成亚硝酸盐的累积也会对海洋生态系统的物质循环能力和生态效率产生显著影响。

3.2 ZnO NPs 和 Phe 影响反硝化过程的主要机制

反硝化还原酶是由反硝化菌合成,硝酸还原酶和亚硝酸还原酶直接参与了 NO_3^- 和 NO_2^- 的还原过程,其活性可直接反映反硝化细菌的功能^[29-30]。刘继鹏^[31]研究发现 Bt 酶蛋白通过抑制 NO_3^- 、 NO_2^- 还原酶活性来对水稻土的反硝化速率产生抑制作用。本研究发现 ZnO NPs 对沉积物硝酸盐还原能力的抑制程度大于 Phe,与 ZnO NPs 对硝酸盐还原酶活性的抑制程度大于 Phe 的结果一致;而 Phe 对沉积物亚硝酸盐还原能力的抑制程度大于 ZnO NPs,也与 Phe 对亚硝酸还原酶活性的抑制程度大于 ZnO NPs 的结果一致,由此可见,反硝化还原酶活性受抑制是影响反硝化过程的主要机制之一。

Wan 等^[32]研究发现 CO_2 通过降低 *nirK*、*nirS* 基因丰度来抑制反硝化作用的进行。本研究中,ZnO NPs 对 *narG* 基因丰度的抑制程度大于 Phe,Phe 对 *nirS* 基因丰度的抑制程度大于 ZnO NPs,也与硝酸盐和亚硝酸盐还原能力所受抑制情况一致,表明 ZnO NPs 和 Phe 对反硝化酶活性和反硝化功能的抑制作用与对反硝化功能基因的复制和基因表达受抑制有关,也是其影响反硝化过程的主要机制之一。

3.3 ZnO NPs 和 Phe 对沉积物反硝化菌群落结构的影响

参与反硝化作用的基因有很多,而亚硝酸盐还原为一氧化氮的反应过程被认为是反硝化作用区别于其它硝酸盐代谢的标志性反应,也是反硝化作用的重要限速步骤,因此对应的编码亚硝酸还原酶基因 *nirS* 常作为研究反硝化群落结构的代表性标志分子^[33],如刘

若萱等^[34]以 *nirS* 基因为代表研究了稻田中的反硝化微生物群落对水分梯度的响应,高美云等^[35]以 *nirS* 基因为代表研究了有机碳对养殖池塘中沉积物反硝化微生物群落的影响。本研究也以 *nirS* 为分子标志,分析沉积物在 ZnO NPs 和 Phe 胁迫下反硝化功能菌群落多样性和组成结构的变化,结果表明在添加 ZnO NPs 和 Phe 后,沉积物中反硝化菌群落多样性水平有所下降。在群落组成方面,与对照组相比,2 个污染物胁迫组在门水平上均表现为变形菌门占比增加、厚壁菌门占比降低;在门水平上均表现为 *Halomonas* 占比增加、*Bacillus* 占比降低。变形菌门下的菌属大多为革兰氏阴性菌,而厚壁菌门下的菌属大多为革兰氏阳性菌,革兰氏阴性菌较革兰氏阳性菌比具有更多的脂多糖,还具有外膜,对污染胁迫具有较强的抵抗性^[36],由此可以解释 *Halomonas* 对污染物的抵抗性要强于 *Bacillus* 的原因。综上所述,ZnO NPs 和 Phe 会引起沉积物中反硝化菌群落结构和组成的改变,在使反硝化功能菌群生物多样性降低的同时,还使 *Bacillus* 的优势度显著降低、*Halomonas* 优势度增加,*Bacillus* 具有降解环境中有毒物质如多环芳烃、有机农药等的的能力^[37],因此可能导致沉积物对有机物降解能力下降,从而影响海洋环境容量。

4 结论

(1) ZnO NPs 和 Phe 对沉积物硝酸盐还原能力和亚硝酸还原能力均产生抑制作用,浓度越高,抑制作用越强,其中亚硝酸盐还原过程受到的抑制更强烈,加重了沉积物亚硝酸盐的累积。

(2) ZnO NPs 对沉积物硝酸盐还原能力、硝酸还原酶活性、*narG* 基因丰度的抑制程度大于 Phe,Phe 对沉积物亚硝酸盐还原能力、亚硝酸还原酶和 *nirS* 基因丰度的抑制程度大于 ZnO NPs,对反硝化还原酶和反硝化功能基因的抑制是外源胁迫影响反硝化过程的主要机制。

(3) ZnO NPs 和 Phe 降低了沉积物反硝化菌群落多样性水平,增加沉积物中 *Halomonas* 的优势度,降低了 *Bacillus* 的优势度,其中 Phe 对沉积物群落多样性和组成的影响更加明显,说明 Phe 对长江口海区的生态影响大于 ZnO NPs。

参考文献:

- [1] Nogales B, Timmis K N, Nedwell D B, et al. Detection and diversity of expressed denitrification genes in estuarine sediments after reverse transcription-PCR amplification from mRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(10): 5017-5025.
- [2] 张晓琳. 长江口、黄河口及邻近海域重金属的分布特征及影响因素研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.

- Zhang X L. Distribution Characteristics and Influencing Factors of Heavy Metals in the Yangtze River Estuary, Yellow River Estuary and Adjacent Waters[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013.
- [3] 赵晓莉, 朱伟. 长三角部分城市污泥 PAHs 质量分数及特征分析[J]. 环境科学研究, 2010, 23(9): 1174-1179.
- Zhao X L, Zhu W. PAHs quality score and characteristic analysis of some urban sludge in Yangtze River delta[J]. Environmental Science Research, 2010, 23(9): 1174-1179.
- [4] 黄俊, 衣俊, 程金平. 长江口及近海水环境中新型污染物研究进展[J]. 环境化学, 2014, 33(9): 1484-1494.
- Huang J, Yi J, Cheng J P. Emerging contaminants in the Yangtze estuary and adjacent coastal area, China[J]. Environmental Chemistry, 2014, 33(9): 1484-1494.
- [5] 张荣秋, 董纯明, 盛华芳, 等. 白令海和楚科奇海表层沉积物中多环芳烃降解微生物多样性[J]. 海洋学报, 2014, 36(4): 52-61.
- Zhang R Q, Dong C M, Sheng H F, et al. Microbial diversity of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments of the Bering Sea and Chukchi Sea[J]. Journal of Oceanography, 2014, 36(4): 52-61.
- [6] Schwab F, Bucheli T D, Camenzuli L, et al. Diuron sorbed to carbon nanotubes exhibits enhanced toxicity to *Chlorella vulgaris*[J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(13): 7012-7019.
- [7] Kumar R, Umar A, Kumar G, et al. Antimicrobial properties of ZnO nanomaterials: A review[J]. Ceramics International, 2017, 43(5): 3940-3961.
- [8] Jiang H S, Yin L, Ren N N, et al. The effect of chronic silver nanoparticles on aquatic system in microcosms[J]. Environmental Pollution, 2017, 223: 395-402.
- [9] Witt G. Polycyclic aromatic hydrocarbons in water and sediment of the Baltic Sea[J]. Marine Pollution Bulletin, 1995, 31: 237-248.
- [10] Soclo H H, Garrigues P, Ewald M. Origin of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coastal marine sediments: Case studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) areas[J]. Marine Pollution Bulletin, 2000, 40(5): 387-396.
- [11] Budzinski H, Jones I, Bellocq J, et al. Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary[J]. Marine Chemistry, 1997, 58(1-2): 85-97.
- [12] Altabet M A, Higginson M J, Murray D W. The effect of millennial-scale changes in Arabian Sea denitrification on atmospheric CO₂[J]. Nature (London), 2002, 415(6868): 159-162.
- [13] Wan R, Chen Y, Zheng X, et al. Effect of CO₂ on NADH production of denitrifying microbes via inhibiting carbon source transport and its metabolism[J]. Science of The Total Environment, 2018, 627: 896-904.
- [14] Wan R, Chen Y G, Zheng X, et al. Effect of CO₂ on microbial denitrification via inhibiting electron transport and consumption[J]. Environmental Science & Technology, 2016, 50(18): 9951-22.
- [15] Wang D, Chen Y. Critical review of the influences of nanoparticles on biological wastewater treatment and sludge digestion[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2016, 36(5): 816-828.
- [16] Warneke S, Schipper L A, Matiassek M G, et al. Nitrate removal, communities of denitrifiers and adverse effects in different carbon substrates for use in denitrification beds[J]. Water Research, 2011, 45(17): 5463-5475.
- [17] Chen Y, Su Y, Zheng X, et al. Alumina nanoparticles-induced effects on wastewater nitrogen and phosphorus removal after short-term and long-term exposure[J]. Water Research (Oxford), 2012, 46(14): 4379-4386.
- [18] 祝陈坚, 李晓虹, 陈洪涛, 等. 水体硝酸盐测定中镉-铜还原柱还原程度的测定方法: 中国, CN101105500[P]. 2008-01-16.
- Zhu C J, Li X H, Chen H T, et al. Method for Determining Reduction Degree of Cadmium-copper Reduction Column in Determination of Nitrate in Water: China, CN101105500[P]. 2008-01-16.
- [19] Bao S, Wang H, Zhang W, et al. An investigation into the effects of silver nanoparticles on natural microbial communities in two freshwater sediments[J]. Environmental Pollution, 2016, 219: 696-704.
- [20] Lópezgutiérrez J C, Henry S, Hallet S, et al. Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR[J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 57(3): 399-407.
- [21] Jarvis A, Enwall K, Throback I N, et al. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 49(3): 401-417.
- [22] Shannon C E. A mathematical theory of communication[J]. The Bell System Technical Journal, 1948, 27(4): 623-656.
- [23] Simpson E H. Measurement of diversity[J]. Nature, 1949, 163(4148): 688-688.
- [24] Nogales B, Timmis K N, Nedwell D B, et al. Detection and diversity of expressed denitrification genes in estuarine sediments after reverse transcription-PCR amplification from mRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(10): 5017-5025.
- [25] 吴伟恒, 阮爱东, 戴韵秋, 等. 雌激素污染对水体微生物反硝化作用的影响[J]. 环境科学与技术, 2014, 37(12): 1-5+15.
- Wu W H, Ruan A D, Dai Y Q, et al. Effect of estrogen pollution on denitrification of water microorganisms[J]. Environmental Science and Technology, 2014, 37(12): 1-5+15.
- [26] 赵迪. 重金属胁迫对滩涂沉积物反硝化作用影响机制的初步研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2013.
- Zhao D. Preliminary Study on the Mechanism of Heavy Metal Stress on Tidal Flat Sediment Denitrification[D]. Shanghai: East China Normal University, 2013.
- [27] 陈卫民, 戴树桂, 张清敏. 水环境中亚硝酸盐聚集的原因及其对动植物的影响[J]. 安全与环境学报, 2011, 11(6): 9-15.
- Chen W M, Dai S G, Zhang Q M. Causes of nitrite accumulation in water environment and its effects on animals and plants[J]. Journal of Safety and Environment, 2011, 11(6): 9-15.
- [28] Zhou Y, Pijuan M, Yuan Z. Free nitrous acid inhibition on anoxic phosphorus uptake and denitrification by poly-phosphate accumulating organisms[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2007, 98(4): 903-912.
- [29] 史奕, 黄国奕. 土壤中反硝化酶活性变化与 N₂O 排放的关系[J]. 应用生态学报, 1999, 10(3): 329-331.
- Shi Y, Huang G H. The relationship between the denitrification enzyme activity in soil and N₂O emission[J]. Journal of Applied Ecology, 1999, 10(3): 329-331.

- [30] 白红英, 韩建刚, 赵一萍. 不同土层土壤理化生性状与反硝化酶活性 N_2O 排放通量的相关性研究[J]. 农业环境科学学报, 2002, 21(3): 193-196.
- Bai H Y, Han J G, Zhao Y P. Correlation study on physical and chemical properties of different soil layers and denitrifying N_2O emission flux[J]. Journal of Agricultural Environmental Science, 2002, 21(3): 193-196.
- [31] 刘继鹏. Bt 蛋白对水稻土反硝化作用和微生物多样性的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
- Liu J P. Effects of Bt Protein on Paddy Soil Denitrification and Microbial Diversity[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013.
- [32] Wan R, Wang L, Chen Y G, et al, Tao X C. Insight into a direct carbon dioxide effect on denitrification and denitrifying bacterial communities in estuarine sediment[J]. The Science of the Total Environment, 2018, 643: 1074-1083.
- [33] Zheng Y L, Hou L J, Liu M, et al. Diversity, abundance, and distribution of nirS-Harboring denitrifiers in intertidal sediments of the Yangtze Estuary[J]. Microbial Ecology, 2015, 70(1): 30-40.
- [34] 刘若萱, 贺纪正, 张丽梅. 稻田土壤不同水分条件下硝化/反硝化作用及其功能微生物的变化特征[J]. 环境科学, 2014, 1(11): 4275-4283.
- Liu R X, He J Z, Zhang L M. Variation characteristics of nitrification/denitrification and functional microorganisms under different moisture conditions in paddy soil[J]. Environmental Science, 2014, 1(11): 4275-4283.
- [35] 高美云, 刘兴国, 曾宪磊, 等. 有机碳对养殖池塘沉积物中反硝化、厌氧氨氧化的影响[J]. 环境工程学报, 2018, 12(1): 49-56.
- Gao M Y, Liu X G, Zeng X L, et al. Effect of organic carbon on denitrification and anaerobic ammonia oxidation in sediments of breeding ponds[J]. Journal of Environmental Engineering, 2018, 12(1): 49-56.
- [36] 钱勇兴. 假单胞菌属对染色废水中典型持久性有机污染物的去除作用机理研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- Qian Y X. Study on the Removal Mechanism of Pseudomonas on Typical Persistent Organic Pollutants in Dyeing Wastewater[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016.
- [37] 赵贵成, 张韬, 高云, 等. 海洋盐单胞菌属微生物的鉴定及生物学活性分析[J]. 第二军医大学学报, 2011, 32(8): 813-817.
- Zhao G C, Zhang T, Gao Y, et al. Identification and biological activity analysis of marine *Halomonas* microorganisms[J]. Journal of Second Military Medical University, 2011, 32(8): 813-817.

Effects of Zinc Oxide Nanoparticles and Phenanthrene on Denitrification and Denitrifying Bacteria Communities of Sediments in the Sea Area Near the Yangtze River Estuary

REN Zhao-Meng¹, BAI Jie^{1,2}, LI Hui^{1,2}, SUN Peng-Fei^{1,3}, CHEN Xi⁴

(1. College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, China; 2. The Key Laboratory of Marine Environment and Ecology, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266100, China; 3. The Fourth Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Beihai 536000, China; 4. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: For comparing the effects of ZnO NPs with Phe on denitrification and denitrifying bacteria communities in estuarine sediments and revealing their action process and possible mechanism, surface sediments were collected from the Yangtze River estuary and then anaerobic cultured in laboratory. The NO_3^- , NO_2^- concentration and NO_3^- , NO_2^- reductase activity in sediments were measured by physico-chemical analysis, *nirS* gene abundance, denitrifying bacteria communities by molecular biological methods. The results showed that ZnO NPs inhibited NO_3^- , NO_2^- reduction capacity and a stronger inhibition effect resulting from the higher ZnO NPs concentration. The reduction process of nitrite was more strongly inhibited by two pollutants, which aggravated the accumulation of nitrite in sediment. The inhibition degrees of ZnO NPs on nitrate reduction capacity, nitrate reductase activity and *narG* gene abundance in sediments were higher than those of Phe, and the inhibition degrees of Phe on nitrite reduction ability, nitrite reductase and *nirS* gene abundance in sediments were higher than those of ZnO NPs, which indicated that the inhibitions of denitrifying reductases and denitrifying function genes were important mechanism of exogenous pollutant stress affecting denitrification. ZnO NPs and Phe reduced the diversity level of denitrifying bacteria in sediments and changed some denitrifying bacteria dominance, including the increase of *Halomonas* and the decrease of *Bacillus* in sediments. However, the effects of Phe on diversity and composition of denitrifying bacteria in sediments were more obvious, indicating that the ecological effects of Phe on the Yangtze River estuary were greater than those of ZnO NPs.

Key words: ZnO NPs; Phe; denitrification; reductase activity; gene abundance; community diversity

责任编辑 徐 环