

ZnO-NPs 对好氧反硝化细菌 *Zobellella* sp.B307 的致毒机制

吴春晗¹,白洁^{1,2},赵阳国^{1,2},任朝萌¹,陈琳¹,李岩然^{3*} (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.中国海洋大学海洋生命学院,山东 青岛 266003)

摘要: 本文以一株筛自胶州湾沉积物中的好氧反硝化细菌 *Zobellella* sp.B307 为研究对象,在短期暴露条件下,通过细菌的生长、脱氮能力,相关酶活以及代谢途径等指标的变化,研究纳米氧化锌(ZnO-NPs)对该菌株的毒性效应;结合锌离子溶出试验、CAT 和 ROS 等氧化应激水平测定,探讨 ZnO-NPs 对该菌株的致毒机制.结果表明,200mg/L 的 ZnO-NPs 会使菌株硝酸盐氮去除率降至 57.53%,LDH 升高至对照组的 378%,ROS 水平高达对照组的 5.34 倍,SOD 活性比对照组升高了 60.32%,NIR 活性仅为对照组的 14.46%;ZnO-NPs 主要通过诱导菌株活性氧的生成使其膜通透性改变、相关酶活性下降,并使相关蛋白质、氨基酸的合成及基因表达等代谢通路受到影响,进而抑制该菌株的反硝化能力;游离锌离子的产生可能不是 ZnO-NPs 对菌株的主要致毒途径.

关键词: 纳米氧化锌(ZnO-NPs); 好氧反硝化细菌; 代谢产物; 氧化应激

中图分类号: X703.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2020)08-3644-10

Toxicity and mechanism of ZnO-NPs on an aerobic denitrifying bacteria strain *Zobellella* sp.B307. WU Chun-han¹, BAI Jie^{1,2}, ZHAO Yang-guo^{1,2}, REN Zhao-meng¹, CHEN Lin¹, LI Kui-ran^{3*} (1.College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, China; 2.Key Laboratory of Marine Environment and Ecology, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266100, China; 3.College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China). *China Environmental Science*, 2020,40(8): 3644~3653

Abstract: In this paper, a strain of aerobic denitrifying bacteria *Zobellella* sp. B307 screened from the sediment of Jiaozhou Bay was studied. Under short-term exposure condition, the toxic effect of ZnO-NPs on the bacterial strain was analysed through the changes in growth, denitrification ability, related enzyme activity and metabolic pathway of the bacteria. The toxicity mechanism of ZnO-NPs on the strain was discussed based on the dissolution test of zinc ions and the oxidative stress levels such as of CAT and ROS. The results showed that comparing with the control group, the addition of ZnO-NPs at 200mg/L could decrease the nitrate removal rate and NIR activity of the strain to 57.53% and 14.46%. Whereas it could increase the LDH、ROS level、SOD activity to 378%、534% and 60.32% respectively. ZnO-NPs could induce the formation of reactive oxygens species and through that, the membrane permeability of strain was changed, the enzyme activity was decreased, and the related pathway of protein, amino acid synthesis and gene expression were affected, which inhibited the denitrification ability of the strain. The production of free zinc ions is not the main cause of toxicity of ZnO-NPs on the bacterial strain.

Key words: Nano zinc oxide (ZnO-NPs); aerobic denitrifying bacteria; metabolites; oxidative stress

随着纳米材料应用日趋广泛,人工纳米材料的使用量逐年递增,纳米氧化锌(ZnO-NPs)因其优良的理化性质被广泛应用于防晒产品、橡胶工业、半导体、纺织品及医疗卫生等领域^[1-3].在 1a 内被填埋的约 30 万 t 的人工纳米材料中,ZnO-NPs 和 TiO₂-NPs 占 94%.ZnO-NPs 在生产、使用和处置过程中均可能被释放进入海洋环境,并造成一定的生理毒性和环境危害.因此,ZnO-NPs 的安全性及潜在毒性受到国内外研究的广泛关注^[4-5].

微生物处于营养级的最底层,是水生和陆地食物链的基础,是维持生态系统稳定的重要角色,纳米颗粒更容易通过影响微生物而破坏生态平衡^[6].细菌是单细胞结构,其染毒环境稳定,作用条件易控制,

便于了解 ZnO-NPs 毒性机制,是用来评价纳米材料安全性的较好的模式生物^[7].*Zobellella* 菌属是近年来所筛选出少见的好氧反硝化菌种^[8],它具有能在有氧条件下短时间内高效脱氮的功能.随着好氧反硝化菌应用范围的扩展,探究 ZnO-NPs 对好氧反硝化功能菌的影响,对明确纳米材料对自然界以及水处理等工程系统中氮素循环的影响和危害有非常重要的理论和现实意义^[9].

关于 ZnO-NPs 毒性的研究目前主要集中在其对典型的动植物、模式微生物(大肠杆菌等)、脱氮

收稿日期: 2020-01-10

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1407602)

* 责任作者, 副教授, likr@ouc.edu.cn

功能菌群(氨氧化菌、厌氧反硝化模式菌、污水处理系统中的单菌或微生物群)的胁迫效应的研究,对于 ZnO-NPs 对好氧反硝化菌株的致毒机制却少有研究^[7].因此,本研究选取 *Zobellella* sp.B307 为研究对象,结合代谢组学,探讨了 ZnO-NPs 的致毒机制,以期为深入研究 ZnO-NPs 对海洋生态系统的潜在影响及作用途径提供科学参考.

1 材料与方法

1.1 ZnO-NPs 表征及母液配置

本实验中 ZnO-NPs 购自 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA),纯度>99.7%,取少量粉末,通过扫描电子显微镜(JSM-7500 型)进行观察表征;取 0.15g ZnO-NPs 溶解于 30mL 经高温灭菌处理后的超纯水中,使用前,冰浴超声 3h,现配现用.

1.2 细菌的培养

实验菌株由本实验室从胶州湾沉积物中分离获得,其 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的登录号为 MF407315,经鉴定为 *Zobellella*.sp 菌属.

培养基:采用本实验室所筛菌株的好氧反硝化培养基,参照白洁等^[10]中的培养基配方.

1.3 *Zobellella* sp.B307 短期 ZnO-NPs 暴露试验

将菌株 *Zobellella* sp.B307 活化,在对数生长期,以 5%的接种量接入培养基.共设置 5 个实验组, ZnO-NPs 浓度分别 0, 5, 20, 50 和 200mg/L,其中 0mg/L 为空白对照,5mg/L 为低浓度组,5, 20mg/L 为中浓度组,200mg/L 为高浓度组.

培养温度 30℃,转速 200r/min,恒温振荡培养 24h,定时取样,测定菌体 OD₆₀₀ 值及 NO₃⁻-N 和 NO₂⁻-N 的浓度.培养结束后,取样测定培养基中乳酸脱氢酶(LDH),收集菌体测定硝酸盐还原酶(NAR)、亚硝酸盐还原酶(NIR)、氧化亚氮还原酶(N₂OR)、活性氧(ROS)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、总抗氧化能力(T-AOC)和相关代谢产物等指标,并用扫描电镜对菌体形态进行观察.每个实验设 3 个平行实验组,每个指标测 3 个平行样.

1.4 ZnO-NPs 溶出锌离子对 *Zobellella* sp.B307 毒性试验

在培养基中分别加入 ZnO-NPs 5, 20, 50 和 200mg/L,在同一条件下培养 24h,培养结束后,高速离心去除培养基中的 ZnO-NPs 颗粒,分别取上清测

定 ZnO-NPs 组培养液中溶解出的 Zn²⁺含量,去除培养基中所含少量 Zn²⁺本底值后的净值,依此确定各组 ZnSO₄加入量分别为 0, 4.09 和 12.15mg/L,分别对应空白、低浓度和中高浓度 ZnO-NPs 组锌离子的溶出量.将菌株 *Zobellella* sp.B307 暴露于这 3 个 Zn²⁺组,相同培养条件下同时取样,测定菌体 OD₆₀₀ 值、NO₃⁻-N 和 NO₂⁻-N 的浓度,用于研究锌离子释放与 ZnO-NPs 致毒之间的关系.

1.5 测定方法

ZnO-NPs 及菌株形态采用扫描电子显微镜(JSM-7500F 型)观察;菌体生长量(OD₆₀₀)采用分光光度法;NO₃⁻-N 采用紫外分光光度法;NO₂⁻-N 采用 N-(1-萘基)-乙二胺光法.

酶提取液制备:取各培养组 100mL 菌液 5000r/min 离心 10min,收获细胞,用 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 3 次,在 4℃重悬于上述缓冲液中,冰浴破碎(20kHz)3min、12000r/min 离心 15min,上清液即为酶提取液.

NAR 和 NIR 活性测定参考 Kristjansson 等^[11]的方法,以 NO₃⁻、NO₂⁻作为电子受体,甲基紫精作为电子供体,在 5mL 反应混合物(0.047mol/L PBS; 1mmol/L NaNO₃/NaNO₂; 7mmol/L Na₂S₂O₄; 0.3mmol/L 甲基紫精)中注射 5mL 酶提取液,引发反应,孵育 30min 后,测定 NO₃⁻、NO₂⁻浓度,计算酶活性.N₂OR 活性参考杨立志等^[12]的方法.绘制 D600 的变化曲线并计算平均斜率,斜率大小反映 N₂OR 的活性,酶活力(U)=平均斜率/底物的摩尔消光系数,在本试验中底物甲基紫精的摩尔消光系数为 5.9mmol/cm.

代谢产物分析采用 Agilent 1290Infinity LC 超高效液相色谱系统(UHPLC)HILIC 色谱柱进行分离,分离后用 Triple TOF 6600 质谱仪(AB SCIEX)进行质谱分析.

ROS 使用流式细胞仪(AccuriTM C6Plus Flow Cytometer)在最佳激发波长 485nm、最佳发射波长 525nm 下进行测定.

LDH、SOD、CAT、T-AOC 活性测定使用南京建成生物工程研究所试剂盒,按照其操作说明书进行操作,吸光度使用酶标仪(Thermo Scientific Multiskan Spectrum)进行测定,经换算后得到每毫克蛋白所含活性单位.培养液中锌离子含量使用 M6 型原子吸收分光光度计进行测定.

1.6 数据分析

数据结果以平均值±标准差表示.统计数据采用统计软件 SPSS 统计软件进行方差分析(One way ANOVA).

2 结果与讨论

2.1 ZnO-NPs 的形貌表征

由图 1 可以看出,扫描电镜下的 ZnO-NPs 多呈 100nm 以下的球状粒子,粒径分布较不均匀,有不同程度的粘连,其表面会受到粒子间静磁力和表面张力的作用,因此会有团聚现象^[13].有研究表明,ZnO-NPs 对细菌的毒性很大程度上取决于其粒径的大小,粒径越小,其比表面积越大,与细菌接触作用的面积越大,毒性也就越强^[14].为了更客观地探究 ZnO-NPs 对菌株 *Zobellella* sp.B307 的毒性效应,避免因 ZnO-NPs 团聚影响实验效果,每次使用前都会对其进行超声处理.

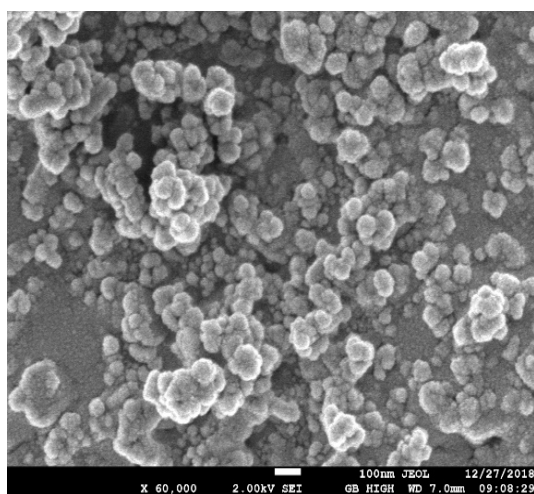


图 1 ZnO-NPs 扫描电镜图
Fig.1 SEM image of ZnO-NPs
放大倍数:60000×

2.2 ZnO-NPs 对菌株 *Zobellella* sp.B307 的毒性效应

2.2.1 对菌株生长的影响 由图 2 可以看出不同浓度的 ZnO-NPs 对菌株 *Zobellella* sp.B307 生长的影响.在投加 ZnO-NPs 的前 4h 差异并不明显;6h 各浓度组间开始出现差异;8h 差异最为明显,对照组 OD₆₀₀ 值已经达到 1.21,而 200mg/L 浓度组的 OD₆₀₀ 值仅为 0.65;但在菌株生长后期,各浓度组与对照组变化趋势无明显差异,OD₆₀₀ 值经过生长平台期后,

都达到 1.4 左右.对照组与 5mg/L 浓度组生长趋势一致,且 5mg/L 浓度组较对照组对 *Zobellella* sp.B307 的生长还有一定的促进作用,这可能是由于低浓度 ZnO-NPs 可以溶出极其微量的 Zn²⁺,作为细菌生长所需的微量元素可以促进其生长.由本研究结果可见,高浓度 ZnO-NPs 对处于对数生长期的菌株生长有一定抑制作用,使细菌总数达到极大值的时间延长,但并未显著降低其极大值的数值($P>0.05$),在培养后期的抑制作用明显减弱,细菌数量回升.

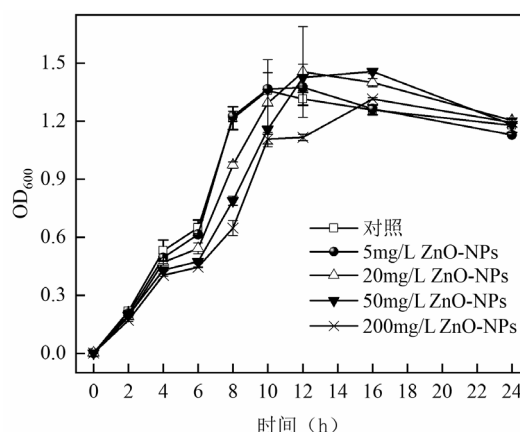


图 2 ZnO-NPs 对 *Zobellella* sp.B307 生长的影响
Fig.2 Effect of ZnO-NPs on growth of *Zobellella* sp. B307

2.2.2 对菌株细胞形态结构的影响 经过 24h 不同浓度 ZnO-NPs 暴露处理后的菌株表面形态的扫描电镜结果如图 3 所示.对照组的细菌呈短杆状,菌体饱满且分散,表面无颗粒物附着(图 3a).ZnO-NPs 浓度为 5mg/L 时,菌体表面较对照组无明显变化,菌体密度较对照组有所升高,可能是由于释放的微量 Zn²⁺对菌株的生长起到了促进作用,与上述该浓度组菌株生长量增加的结果一致,文献[15-16]也表明,浓度低于一定值的 ZnO-NPs 对微生物的生长不但不会抑制,反而会有有一定的促进作用.当浓度升高至 20 和 50mg/L 时,细胞膜结构破坏,胞内物质渗漏,导致细胞之间粘滞性增加,开始出现团聚现象(图 3c). 200mg/L 时,菌体表面几乎被颗粒物全部覆盖,细胞之间出现明显的粘连和团聚.有研究表明,纳米金属氧化物的主要抗菌机制是纳米粒子对细菌的物理作用,ZnO-NPs 因有较大的比表面积,易与细菌表面发生大面积接触和作用,纳米粒子会附着在细菌上,堵塞细胞壁、膜和离子通道,引起细胞膜通透性的改变,干扰营养物质的运输和离子交换^[15],上述结果与此有关.

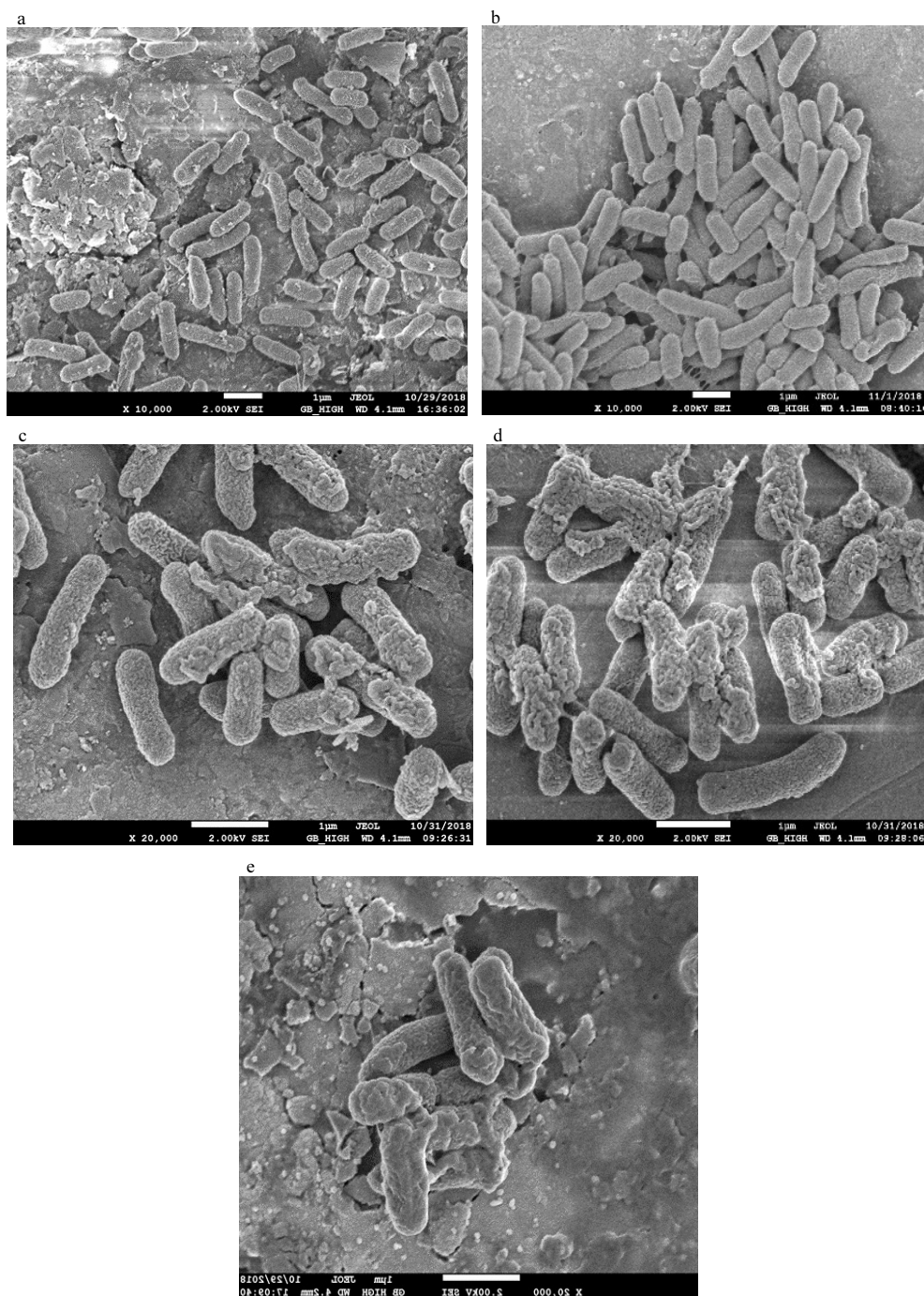


图3 ZnO-NPs 浓度对 *Zobellella* sp.B307 表面形态的影响

Fig.3 Effect of ZnO-NPs on morphology of *Zobellella* sp. B307

(a)对照1(b)5mg/L (c)20mg/L (d)50mg/L (e)200mg/L,其中 a、b 放大 10000 倍,c、d、e 放大 20000 倍

2.2.3 对菌株细胞细胞膜功能的影响 LDH 在细胞溶质内含量非常丰富,正常状态下其不能通过细胞膜,但当细胞受到损伤或死亡时可释放到细胞外,此时细胞培养液中 LDH 的活性与细胞的死亡数目呈正比,因此,LDH 释放作为膜损伤的指标,可用于表征 ZnO-NPs 对菌株细胞膜完整性和通透性的影响.由图 4 可见,当 ZnO-NPs 浓度为 5 和 20mg/L 时,培

养液中 LDH 的含量与对照组无显著差异($P>0.05$);当浓度上升至 50 和 200mg/L 时,培养液中 LDH 的含量分别达到对照组的 315%和 378%,显著高于对照组($P<0.05$).可见,随 ZnO-NPs 浓度升高,培养液中 LDH 的活性逐渐增大,表明此时细胞膜通透性增加,细胞逐渐趋于溶解死亡.Li 等^[16]的研究也显示 ZnO-NPs 会导致大肠杆菌的菌膜破裂,继而引发菌

体死亡,Xie 等^[17]对空肠弯曲杆菌的研究也发现 ZnO-NPs 粒子可导致细菌内容物泄露。

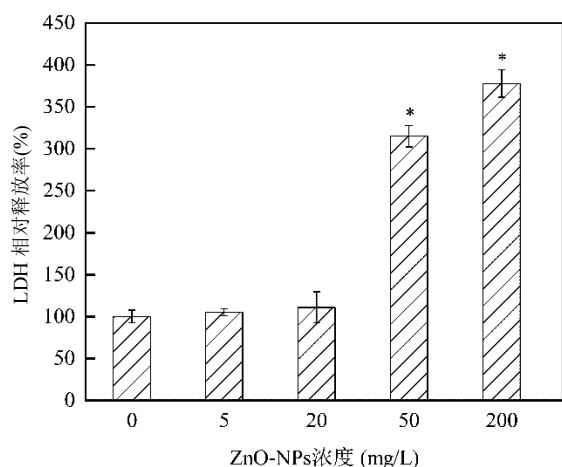


图4 ZnO-NPs 对 *Zobelletta* sp.B307 细胞膜的影响

Fig.4 Effect of ZnO-NPs on cytomembrane of *Zobelletta* sp. B307

*表示与对照组的差异具有显著性, $P<0.05$

2.2.4 对菌株好氧反硝化关键过程的影响 研究表明高浓度的 ZnO-NPs 对微生物活性污泥厌氧消化产气效率、有机物降解效率和污泥减量效果等会产生显著抑制^[18].ZnO-NPs 对菌株硝酸盐去除能力的影响如图 5 所示,不同浓度 ZnO-NPs 对菌株 NO_3^- -N 去除效率的影响不同,暴露 24h 后,对照组 NO_3^- -N 去除效率达到 93.36%;5mg/L 浓度组的去除率达到 95.63%,与对照组无明显差异,甚至略优于对照组,这与上文低浓度组菌株生长速率略有增加的结果一致,可能是由于 ZnO-NPs 促进了菌株的生长,从而间接提高了菌株对 NO_3^- -N 的去除效率.20mg/L 浓度组在暴露的前 8h 去除率显著低于对照组,在 10h 时去除率达到 90.84%,但与对照组无显著差异 ($P>0.05$).50 和 200mg/L 浓度组在暴露的前 8h 去除率显著低于对照组;12h 后 50mg/L 浓度组 NO_3^- -N 的去除率显著回升至 94.62%,已与对照组无显著差异 ($P>0.05$);而 200mg/L 浓度组直至暴露 24h 后,体系中 NO_3^- -N 去除效率仍仅为 57.53%较对照组差异显著 ($P<0.05$).

对亚硝酸盐积累量的影响见图 6.细菌在脱氮过程中,会先将体系中的 NO_3^- -N 转化为 NO_2^- -N,再转化为 N_2O 及 N_2 释放,因此在脱氮过程中,体系中会出现 NO_2^- -N 的积累.5mg/L 浓度组 NO_2^- -N 累积趋势

与对照组基本一致,在暴露 4h 体系中累积量达到峰值,为 5.03mg/L;中、高浓度组 NO_2^- -N 分别在暴露 8 和 10h 时出现累积量峰值,其中 50 和 200mg/L 浓度组累积量分别达到 55.05 和 104.69mg/L,显著高于对照组 ($P<0.05$),并均较对照组有不同程度的延迟,表明 ZnO-NPs 暴露前期对菌株将 NO_3^- -N 转化为 NO_2^- -N 的过程的抑制作用更显著;暴露 24h 后,对照组和低、中浓度组的 NO_2^- -N 均被完全去除,已不存在累积现象,只有高浓度组 NO_2^- -N 累积量仍高达 20mg/L,表明低、中浓度组受抑制的反硝化能力在培养后期基本恢复,只有高浓度组对反硝化过程的抑制作用持续存在。

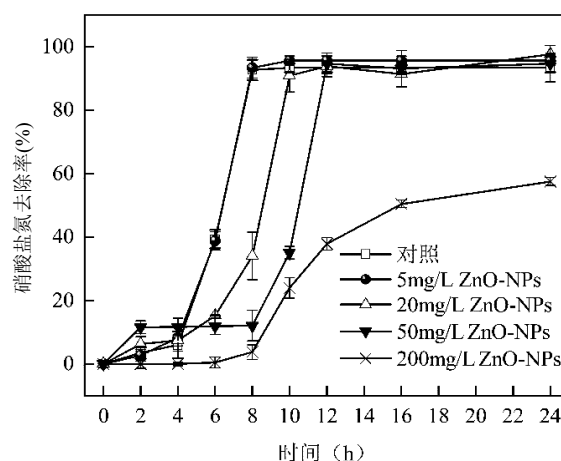


图5 ZnO-NPs 对 NO_3^- -N 去除率的影响

Fig.5 Effect of ZnO-NPs on removal efficiency of NO_3^- -N

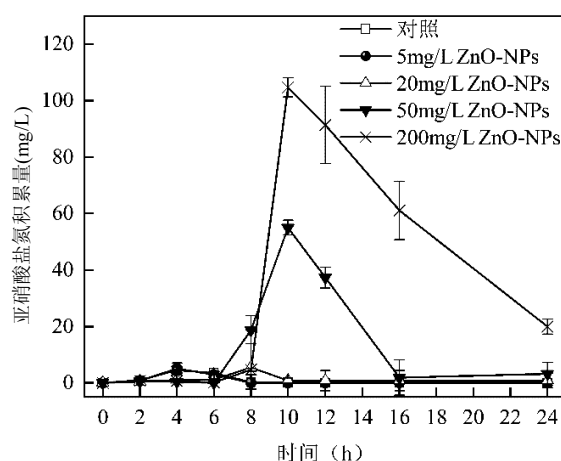


图6 ZnO-NPs 对 NO_2^- -N 积累量的影响

Fig.6 Effect of ZnO-NPs on volume accumulation of NO_2^- -N

对反硝化作用酶活性的影响如图 7 所示,经过 ZnO-NPs 24h 暴露后,5mg/L 浓度组反硝化酶活性与对照组无显著差异 ($P>0.05$);浓度为 20mg/L 时,仅

N_2OR 活性与对照组差异显著($P<0.05$),为对照组的 55.68%;浓度为 50mg/L 时, N_2OR 和 NAR 、 NIR 活性均与对照组有显著差异($P<0.05$),分别为对照组的 38.20%、46.07%、和 83.74%;200mg/L 浓度组对 3 种酶活性的抑制程度更为明显,影响最显著的 NIR 活性仅为对照组的 14.46%。表明低浓度 ZnO-NPs 对反硝化过程无显著影响;浓度为 20mg/L 时,仅对 N_2O 还原过程产生显著影响;浓度为 500mg/L 时,对 3 个反硝化过程均产生显著抑,但对 N_2O 还原过程影响最为显著;高浓度组对 3 个反硝化过程的抑制程度更为显著,且对 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 还原过程抑制最为明显。由此可见, ZnO-NPs 对 *Zobellella* sp.B307 不同反硝化酶活性及脱氮过程的影响与其浓度有关,随浓度的升高,所影响的酶种类越多、受影响的过程越多、影响程度越显著。有研究表明^[19-21],ZnO-NPs 因其具有较高的比表面积,易吸附 Fe、Mo 和 Cu 等与反硝化酶活性密切相关的金属离子,加之菌体结构受到破坏,酶合成能力下降,从而导致反硝化酶活性的降低。

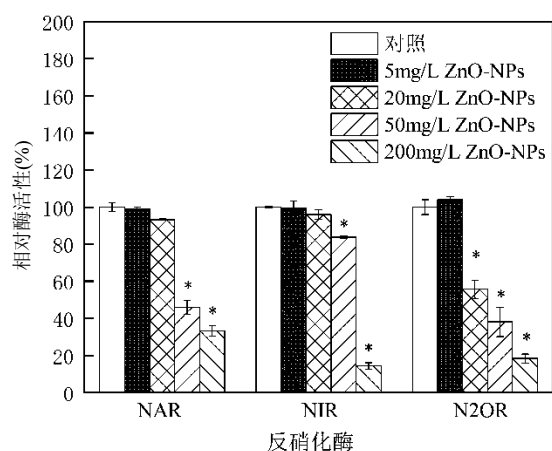


图 7 ZnO-NPs 对 *Zobellella* sp.B307 反硝化酶活性的影响
Fig.7 Effect of ZnO-NPs on enzyme activity of *Zobellella* sp. B307

由上述结果可以看出,不同浓度 ZnO-NPs 对菌株 *Zobellella* sp.B307 的 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 去除能力及酶活性的影响不同。低浓度组的影响不显著;中浓度组对 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 去除能力在暴露前期有显著抑制,加上 NIR 的活性也受到抑制,因而造成 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 累积,但暴露后期抑制作用减弱, $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 均被完全去除;高浓度组菌株去除 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 的能力及各酶活性均受到显著抑制,反硝化能力显著降低,在暴露前期对菌株将 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 转化为 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 的能力的

抑制作用更显著,后期对 NIR 和 N_2OR 活性的抑制程度显著高于 NAR ,因此导致 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 和 N_2O 的去除能力低于 $\text{NO}_3^- \text{-N}$,这种结果可能会导致体系中 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 和 N_2O 的累积,由此带来的环境影响将更为严重。

2.2.5 对菌株代谢通路的影响 将培养 24h 后的高浓度 ZnO-NPs 暴露组 and 对照组菌体进行质谱分析,共鉴定到 124 个差异代谢产物,将差异代谢产物进行 KEGG 信号通路分析。根据 KEGG 富集汇总表,选择了调控通路显著性最强的 10 条通路,结果如图 8 所示。

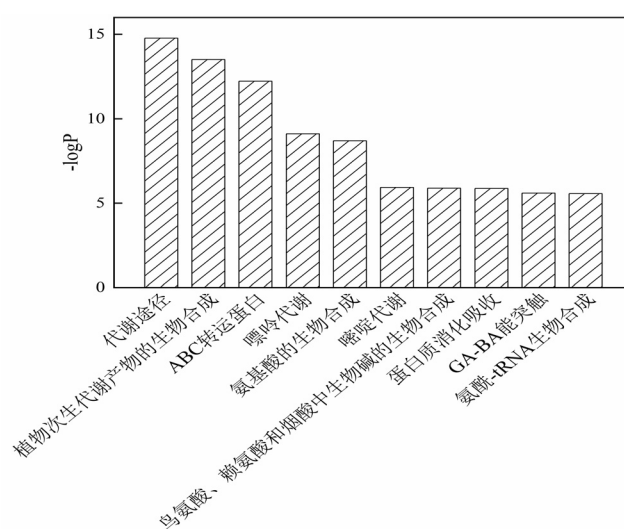


图 8 ZnO-NPs 对 *Zobellella* sp.B307 代谢途径的影响
Fig.8 Effect of ZnO-NPs on metabolic pathways of *Zobellella* sp. B307

由图 8 可知,差异代谢产物在代谢途径最为集中;在植物次生代谢产物合成通路的富集较多,可能与细菌受到纳米材料刺激时会分泌更多次生代谢物如茶多酚、单宁和类黄酮,将纳米材料包裹有关^[22-23];此外,暴露组和对照组在 ABC 转运蛋白的代谢、嘌呤代谢、嘧啶代谢、氨基酸的生物合成、蛋白质生物合成和氨酰 t-RNA 生物合成途径都有显著差异($P<0.05$),其中 ABC 转运蛋白的代谢差异最明显。ABC 转运蛋白是细菌体内最重要的蛋白之一,它们将 ATP 水解与各种底物的主动运输结合在一起;嘌呤代谢和嘧啶代谢与氮元素的代谢息息相关;氨酰-tRNA 具有基因表达调控、调节氨基酸合成、信号传导等方面的功能^[24]。由此可以看出,ZnO-NPs 对 *Zobellella* sp.B307 代谢通路的作用主要与对菌株相关蛋白质、氨基酸的合成,以及基因表达调控和氮

元素的代谢影响有关.

2.3 ZnO-NPs对菌株 *Zobellella* sp.B307的致毒机制

2.3.1 Zn^{2+} 释放对菌株的致毒作用

有研究表明, ZnO-NPs 能够通过释放锌离子,从而促进细胞吞噬泡的形成,进而导致细胞死亡,且其毒性效应与其粒径大小、暴露方式、暴露剂量以及时间等多种因素相关^[25].本研究测定了 24h 暴露后不同浓度 ZnO-NPs 培养液中的锌离子浓度,结果见图 9. ZnO-NPs 浓度为 5mg/L 时,培养液中锌离子浓度为 4.09mg/L; 当 ZnO-NPs 为 20, 50, 200mg/L 的各浓度组培养液中锌离子均稳定在 12.15mg/L 左右,表明该浓度为其离子释放的平衡浓度,因此以加入 ZnSO_4 后锌离子浓度为 4.09 和 12.15mg/L 分别代表低浓度和中高浓度 ZnO-NPs 组锌离子的溶出量.

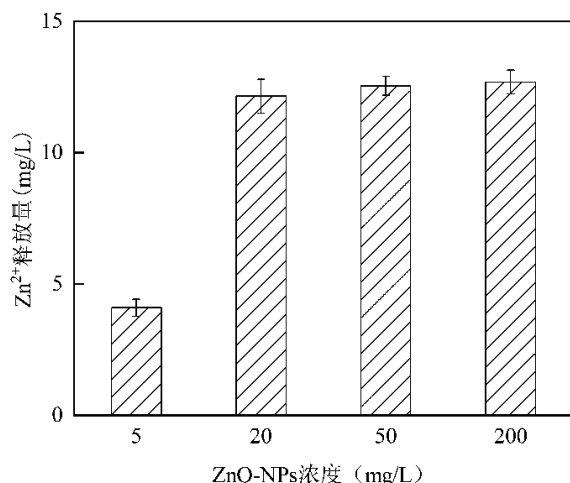


图 9 ZnO-NPs 的锌离子释放量

Fig.9 The Zinc ions release amount of ZnO-NPs

ZnO-NPs 可以在含水介质中持续缓慢释放 Zn^{2+} ,高浓度的金属离子会破坏菌体内原有稳态,继而对细菌产生毒性^[26].通过添加与 ZnO-NPs 释放等当量 Zn^{2+} 的 ZnSO_4 对菌株的影响见图 10.由图 10a 结果表明,不同锌离子释放量对菌株的生长均没有显著影响($P>0.05$),且少量锌离子对菌株的生长有一定的促进作用.图 10b 表明在暴露的前 6h,不同浓度的锌离子会对菌株的硝酸盐氮去除效率有不同程度的抑制作用,但在 8h 后暴露组与对照组变化趋于一致;图 10c 显示不同浓度锌离子暴露组与对照组亚硝酸盐氮积累量峰值都出现在 6h,但各组间积累量大小有所不同($P>0.05$),这可能与锌离子对硝酸盐氮转化的轻微抑制有关;在 8h 时暴露组与对照组亚

硝酸盐氮都被完全去除.相比于 ZnO-NPs 对 *Zobellella* sp.B307 除氮效果的抑制作用,等当量 ZnSO_4 对菌株脱氮能力的抑制作用并不显著.有研究也表明,10 倍于 ZnO-NPs 浓度的 ZnCl_2 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌都未获得理想的抗菌效果^[27].由此可见,锌离子的释放可能不是 ZnO-NPs 对 *Zobellella* sp.B307 的主要致毒途径.

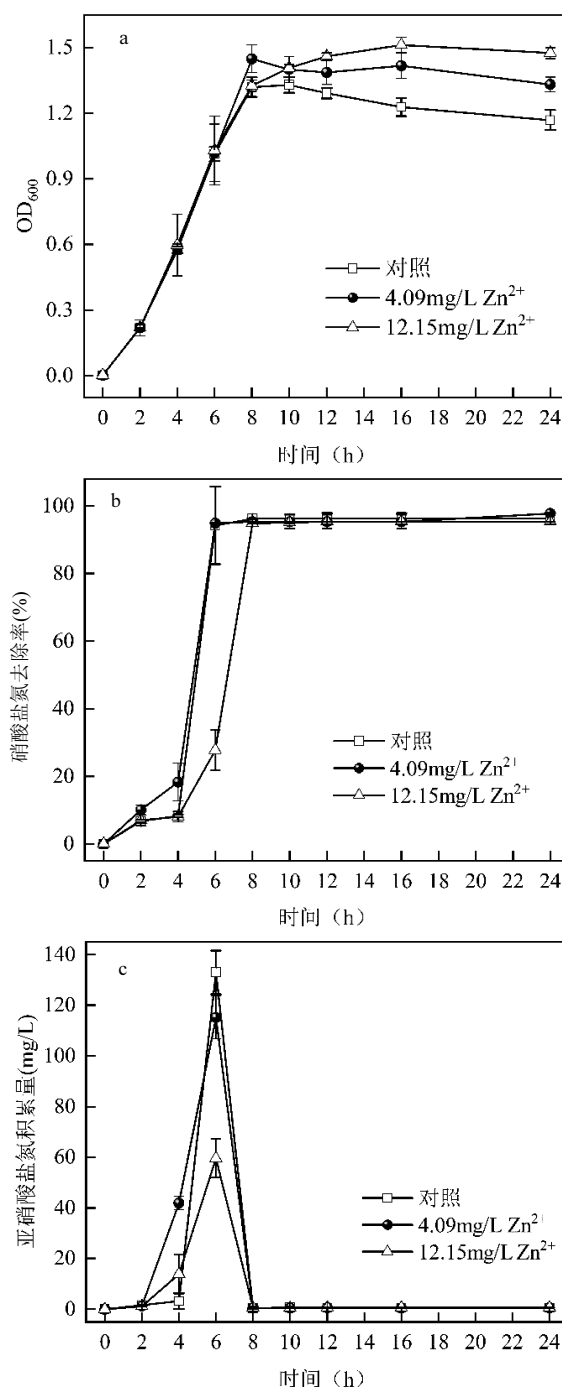


图 10 Zn^{2+} 释放对 *Zobellella* sp.B307 的影响

Fig.10 Effect of Zinc ions release on *Zobellella* sp. B307

(a) OD_{600} (b) NO_3^- -N (c) NO_2^- -N

2.3.2 氧化胁迫对菌株的毒性作用 Kumar 等^[28] 研究表明 ZnO-NPs 能被细菌内化并且产生显著的氧化胁迫,最终导致细胞的凋亡.田文静等^[29]也证明氧化应激是 ZnO-NPs 导致斑马鱼胚胎细胞损

伤的作用机制之一.本文通过研究 ZnO-NPs 对菌株胞内 ROS 水平、SOD、CAT、T-AOC 活性等生理生化指标的变化,以揭示氧化胁迫在 ZnO-NPs 对菌株致毒机制中的作用,结果见图 11.

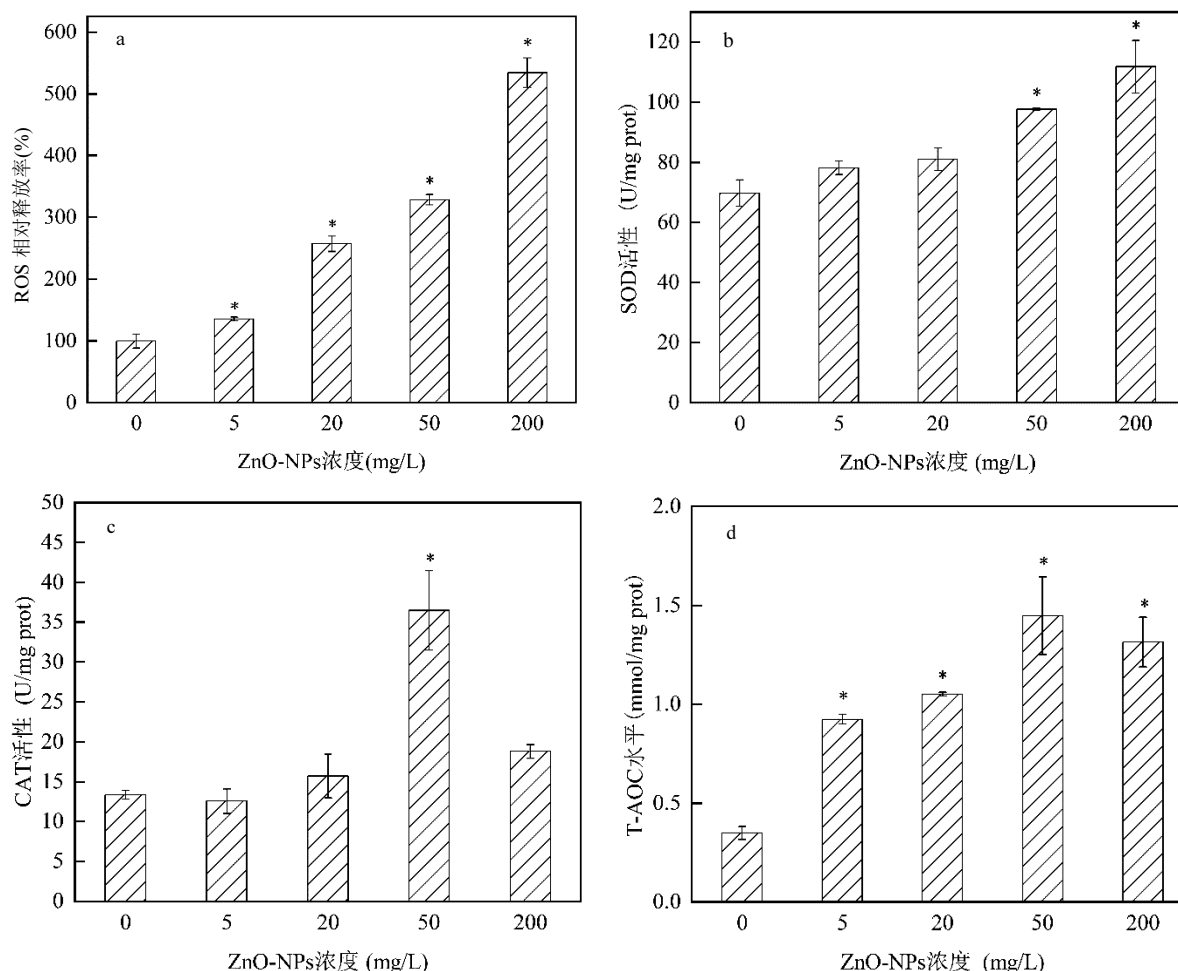


图 11 氧化胁迫机制对 *Zobellella* sp.B307 的影响

Fig.11 Effect of oxidative stress mechanism on *Zobellella* sp. B307

(a)ROS (b)SOD (c)CAT (d)T-AOC

图 11a 为以对照组 ROS 的释放率为 100% 时各 ZnO-NPs 浓度组 ROS 的相对释放率.由图可知,各浓度暴露组与对照组的 ROS 释放率均存在显著差异 ($P < 0.05$).5mg/L 浓度 ZnO-NPs 即能引起胞内 ROS 的显著释放,为对照组的 1.35 倍,随暴露浓度增加 ROS 的释放量显著增加,到 200mg/L 浓度组时,ROS 水平高达对照组的 5.34 倍.表明 ROS 诱导的细胞损伤可能在 ZnO-NPs 对菌株的致毒过程中起着重要作用^[31].有研究表明,一些活性氧的活性能高到足以破坏几乎所有类型的生物分子,如羟基自由基($\cdot\text{OH}$)的氧化电位为 2.78V,可以对碳水化合物、核酸、脂

类、蛋白质、DNA 和氨基酸进行非选择性损伤^[30].

从图 11b 可以看出,当 ZnO-NPs 浓度为 5 和 20mg/L 时,SOD 酶活性与对照组相比无显著差异 ($P > 0.05$);当浓度上升至 50mg/L 时,SOD 活性与对照组差异显著,浓度为 200mg/L 时,SOD 活性比对照组升高了 60.32%,随 ZnO-NPs 浓度增加,菌株 SOD 酶活性逐渐增强,与菌株胞内的超氧自由基增多有关,表明 ZnO-NPs 对菌株的毒性作用与菌体产生及清除超氧阴离子自由基的过程有关^[32].

由图 11c 可知,ZnO-NPs 浓度为 5 和 20mg/L 时,CAT 活性与对照组无显著差异 ($P > 0.05$);浓度为

50mg/L 时,CAT 活性较对照组显著增加,为对照组的 2.73 倍;而高浓度组的 CAT 活性与对照组并无显著差异,可能是 ZnO-NPs 浓度过高,超出细菌氧化应激防御系统的去除能力,造成 CAT 活性被抑制^[29].H₂O₂ 可穿透大部分细胞膜,它比不能穿透细胞膜的超氧阴离子自由基具有更强的细胞毒性,CAT 的作用是促使 H₂O₂ 分解为分子氧和水,使细胞免于遭受 H₂O₂ 的毒害^[33-34],因此,ZnO-NPs 对菌株 CAT 活性的抑制将使细胞受 H₂O₂ 的毒害作用增强.

由图 11d 可以看出,ZnO-NPs 暴露组与对照组 T-AOC 均存在显著差异($P<0.05$),50mg/L 浓度组 T-AOC 活性是对照组的 3.77 倍,且其变化趋势和 CAT 一致,可能是由于高浓度 ZnO-NPs 暴露下,细胞发生损伤,活菌减少,导致抗氧化体系调节失衡,总抗氧化能力减弱.细菌有酶促与非酶促两个抗氧化防御体系,T-AOC 是评价这两个体系防御能力的总指标,反映了细菌抗氧化力的总体水平,高浓度组 T-AOC 水平的显著降低,也进一步表明 ZnO-NPs 对菌株的毒性作用与其对细胞总抗氧化力的抑制有关.

3 结论

3.1 ZnO-NPs 会改变菌株细胞膜通透性,影响相关蛋白质、氨基酸的合成及基因表达等代谢通路,抑制其还原酶活性和脱氮能力,且浓度越高,毒性效应越明显.

3.2 ZnO-NPs 对菌株的主要致毒机制包括促进活性氧的产生、诱导菌体产生及清除超氧阴离子自由基和抑制菌株总抗氧化力,使细胞因 H₂O₂ 和超氧阴离子自由基的毒害作用受到损伤.

3.3 在暴露前期 ZnO-NPs 对菌株将 NO₃⁻-N 转化为 NO₂⁻-N 能力的抑制作用更显著,后期对 NIR 和 N₂O 活性的抑制程度显著高于 NAR,因此使 NO₂⁻-N 和 N₂O 的去除能力低于 NO₃⁻-N,导致体系中 NO₂⁻-N 大量累积,由此带来的环境影响可能更为严重.

参考文献:

[1] 张立德.我国纳米材料技术应用的现状和产业化的机遇 [J]. 材料导报, 2001,15(7):2-5.
Zhang L D. Current situation of nanomaterials technology application and Opportunities for Industrialization in China [J]. Materials Reports, 2001,15(7):6-9.

[2] 朱世东,周根树,蔡锐,等.纳米材料国内外研究进展 I——纳米材料的结构、特异效应与性能 [J]. 热处理技术与装备, 2010,31(3): 1-5,26.
Zhu S D, Zhou G S, Cai R, et al. Nanomaterials research progress at home and abroad I - structure, the specific effect and properties of nanometer materials [J]. Heat Treatment Technology and Equipment, 2010,31(3):1-5,26.
[3] 周全法.纳米材料的应用和产业化 [J]. 江苏技术师范学院学报, 2002,8(4):83-87,107.
Zhou Q F. Application and industrialization of nanomaterials [J]. Journal of Jiangsu Teachers University of Technology, 2002,8(4):83-87,107.
[4] Maynard A D, Aitken R J, Butz T, et al. Safe handling of nanotechnology [J]. Nature, 2006,444(7117):267-269.
[5] 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.
[6] 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(4):1659-1664.
[7] 潘少兵,邱凤仙,余世金.纳米氧化锌毒性研究进展 [J]. 科学技术创新, 2016,110(33):116-116.
Pan S B, Qiu F X, Yu S J. Research progress of toxicity of nano-zinc oxide [J]. Scientific and Technological Innovation, 2016,110(33):116-116.
[8] 李小义,王丽萍,杜雅萍,等.好氧反硝化微生物多样性及其反硝化功能初步研究 [J]. 氨基酸和生物资源, 2016,38(2):37-45.
Li X Y, Wang L P, Du Y P, et al. Microbial diversity and denitrification function of aerobic denitrification [J]. Amino Acids and Biotic Resources, 2016,38(2):37-45.
[9] 梁书诚,赵敏,卢磊,等.好氧反硝化菌脱氮特性研究进展 [J]. 应用生态学报, 2010,21(6):1581-1588.
Liang S C, Zhao M, Lu L, et al. Research progress of nitrogen removal characteristics of aerobic denitrifying bacteria [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2010,21(6):1581-1588.
[10] 白洁,陈琳,黄潇,等.1 株耐盐异养硝化-好氧反硝化菌 *Zobellella* sp. B307 的分离及脱氮特性 [J]. 环境科学, 2018,39(10): 403-411.
Bai J, Chen L, Huang X, et al. Isolation and denitrification of a strain of salt-tolerant heterotrophic nitrification aerobic denitrification bacterium *Zobellella* SP. B307 [J]. Environmental Science, 2018, 39(10):403-411.
[11] Kristjansson J K, Hollocher T C. First practical assay for soluble nitrous oxide reductase of denitrifying bacteria and a partial kinetic characterization [J]. Journal of Biological Chemistry, 1980,255(2): 704-707.
[12] 杨立志,王鹏胤,胡南.M.hydrocarbonoclasticus NY4 中 *nosZ* 基因的克隆与异源表达 [J]. 华中农业大学学报, 2017,36(2):64-68.
Yang L Z, Wang P Y, Hu N, et al. Cloning and heterologous expression of *nosZ* gene in *M. hydrocarbonoclasticus* NY4 [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2017,36(2):64-68.
[13] Zhang L, Manthiram A. Chains composed of nanosize metal particles and identifying the factors driving their formation [J]. Applied Physics

- Letters, 1997,70(18):2469–2471.
- [14] Ma H, Williams P L, Diamond S A. Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles — a review [J]. Environmental Pollution, 2013,172(1): 76–85.
- [15] Roselli M, Finamore A, Garaguso I, et al. Zinc oxide protects cultured enterocytes from the damage induced by escherichia coli [J]. The Journal of Nutrition, 2003,133(12):4077–4082.
- [16] Li M, Lin D, Zhu L. Effects of water chemistry on the dissolution of ZnO nanoparticles and their toxicity to Escherichia coli [J]. Environmental Pollution, 2013,173(2):97–102.
- [17] 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(7):2325–2331.
- [18] 王树涛,陈玲波,张真瑞,等.氧化锌纳米颗粒对污泥厌氧消化过程的影响研究 [J]. 中国环境科学, 2017,37(1):174–180.
- Wang S T, Chen L B, Zhang Z R, et al. Effects of zno nanoparticles on sludge anaerobic digestion [J]. China Environmental Science, 2017, 37(1):174–180.
- [19] Moura I, Moura J J. Structural aspects of denitrifying enzymes. [J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2001,5(2):168–175.
- [20] Granger J, Ward B B. Accumulation of nitrogen oxides in copper-limited cultures of denitrifying bacteria [J]. Limnology and Oceanography, 2003,48(1):313–318.
- [21] Labbe N, Parent S, Villemur R. Addition of trace metals increases denitrification rate in closed marine systems [J]. Water Research, 2003,37(4):914–920.
- [22] Muhammad O, Talha K A, Nazar U I, et al. Role of plant phytochemicals and microbial enzymes in biosynthesis of metallic nanoparticles [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(16):6799–6814.
- [23] 李玲丽.纳米材料的生物响应、生物合成及利用 [D]. 中国科学技术大学, 2017.
- Li L L. Biological response, biosynthesis and utilization of nanomaterials [D]. University of Science and Technology of China, 2017.
- [24] Mei W S, Gang Z C. New insights on the structure and function of glutamyl-prolyl-tRNA synthetase [J]. Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences, 2006,30(2):166–168.
- [25] 赵琳,陈瑞,陈锋,等.纳米氧化锌毒性效应及毒理学机制研究进展 [J]. 毒理学杂志, 2016,30(2):161–166.
- Zhao L, Chen R, Chen F, et al. Research progress on the toxic effects and toxicological mechanism of nano-zinc oxide [J]. Journal of Toxicology, 2016,30(2):161–166.
- [26] Pasquet J, Chevalier Y, Couval E, et al. Antimicrobial activity of zinc oxide particles on five microorganisms of the Challenge Tests related to their physicochemical properties [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2014,460(2):92–100.
- [27] Sawai J. Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay [J]. Journal of Microbiological Methods, 2003,54(2):177–182.
- [28] Kumar A, Pandey A K, Singh S S, et al. Engineered ZnO and TiO₂ nanoparticles induce oxidative stress and DNA damage leading to reduced viability of Escherichia coli [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2011,51(10):1872–1881.
- [29] 田文静,白伟,赵春禄,等.纳米 ZnO 对斑马鱼胚胎抗氧化酶系统的影响 [J]. 中国环境科学, 2010,30(5):705–709.
- Tian W J, Bai W, Zhao C L, et al. Effect of Nano-ZnO on Zebrafish embryo antioxidant enzyme system [J]. China Environmental Science, 2010,30(5):705–709.
- [30] Djurisic A B, Leung Y H, Xu X Y, et al. Toxicity of metal oxide nanoparticles: Mechanisms, characterization, and avoiding experimental artifacts [J]. Small, 2015,11(1):26–44.
- [31] Wang D, Zhao L X, Ma H Y, et al. Quantitative analysis of reactive oxygen species photogenerated on metal oxide nanoparticles and their bacteria toxicity: The role of superoxide radicals [J]. Environmental Science & Technology, 2017,51(17):10137–10145.
- [32] Djurisic A B, Leung Y H, Xu X Y, et al. Toxicity of metal oxide nanoparticles: Mechanisms, characterization, and avoiding experimental artifacts [J]. Small, 2015,11(1):26–44.
- [33] An Y, Shen Y B, Zhang Z X. Effects of mechanical damage and herbivore wounding on H₂O₂ metabolism and antioxidant enzyme activities in hybrid poplar leaves [J]. Journal of Forestry Research, 2009,20(2):156–160.
- [34] 王大彬,赵利霞,郭良宏,等.连续流动化学发光法在线定量检测二氧化钛光催化产生的 O₂^{•-} 和 H₂O₂ 及其生成动力学研究 [J]. 化学学报, 2015,73(5):388–394.
- Wang D B, Zhao L X, Guo L H, et al. Online quantification of O₂^{•-} and H₂O₂ and their formation kinetics in ultraviolet (UV)-irradiated nano-TiO₂ suspensions by continuous flow chemiluminescence [J]. Acta Chimica Sinica, 2015,73(5):388–394.
- [35] Hirakawa T, Nosaka Y, et al. Properties of O₂^{•-} and OH[•] formed in TiO₂ aqueous suspensions by photocatalytic reaction and the influence of H₂O₂ and some ions [J]. Langmuir, 2002,18(18):3247–3254.

作者简介: 吴春晗(1995–),女,内蒙古满洲里人,中国海洋大学硕士研究生,主要从事环境生态学研究.发表论文 2 篇.