

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20171031001

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 J J, Cui M H, Zhang Y Y, 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)

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

杜京京^{1,2,*}, 崔明会¹, 张玉燕¹, 郭瑞林¹, 高玉聪¹, 胡丹¹

1. 郑州轻工业学院 材料与化学工程学院, 郑州 450002

2. 环境污染治理与生态修复河南省协同创新中心, 郑州 450002

收稿日期: 2017-10-31 录用日期: 2017-12-12

摘要: 随着纳米技术的迅速发展, 纳米氧化锌广泛应用于抗菌涂料、电子装置、个人护理品等产品中, 其生态毒理机制已成为生态学的研究热点。为了探究水生丝状真菌对纳米氧化锌的响应及适应机制, 本文选用3种不同粒径的纳米氧化锌 30 nm、90 nm 和 200 nm 作为影响因子, 通过室内模拟钻天杨 *Populus nigra* L. 凋落叶降解过程, 研究纳米氧化锌的慢性暴露对水生丝状真菌生物量及代谢功能的影响效应, 其中包括真菌的生孢率、群落多样性、脱氢酶活性、胞外降解酶活性、体系 pH 值、凋落叶降解速率以及碳氮含量, 结果表明, 粒径较小的纳米氧化锌(如 30 和 90 nm)对水生丝状真菌活性及细菌代谢功能的抑制作用更强, 且抑制作用达到显著水平所需的时间越短。46 d 的慢性暴露显著影响了水生丝状真菌的生孢率与群落组成, 其中 *Alatospora* 的生孢率与凋落叶降解速率呈显著负相关, 表明该菌是纳米氧化锌的敏感菌, 而 *Anguillospora* 和 *Flabelliospora* 在纳米氧化锌的介入环境中产出较多的分生孢子, 表明其为纳米氧化锌的耐受菌。另外, 纳米氧化锌的长期暴露使水生丝状真菌对有机氮的降解功能具有促进作用, 而对有机碳的代谢功能没有明显影响。总之, 水生丝状真菌对纳米氧化锌的响应导致了凋落叶降解速率及碳氮分解效率在各处理间呈现显著差异。综上所述, 本研究为纳米氧化锌对生态过程的毒理机制提供了必要的理论基础。

关键词: 纳米氧化锌; 水生丝状真菌; 凋落物降解; 胞外酶活性

文章编号: 1673-5897(2018)2-149-010 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Impacts of Nano-scale ZnO on Microbial Community Composition and Degrading Activities Associated with Leaf Litter Decomposition

Du Jingjing^{1,2,*}, Cui Minghui¹, Zhang Yuyan¹, Guo Ruilin¹, Gao Yucong¹, Hu Dan¹

1. School of Materials and Chemical Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China

2. Henan Collaborative Innovation Center of Environmental Pollution Control and Ecological Restoration, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China

Received 31 October 2017 accepted 12 December 2017

Abstract: With the development of nanotechnology, nanomaterials have been widely used in the anti-bacterial coating, electronic device, personal care products, and so on. The ecotoxicity of nanomaterials has already become

基金项目: 国家青年科学基金项目(31500377)

作者简介: 杜京京(1986-), 讲师, 研究方向为环境微生物学、生态修复学, E-mail: dujj@zzuli.edu.cn

one of the research hotspots. To investigate the response and adaptation mechanism of aquatic hyphomycetes to nano-ZnO, indoor experiments were carried out to simulate the process of litter decomposition of *Populus nigra* L. leaf with different size nano-ZnO (30, 90, and 200 nm) as influence factors. The biomass and metabolic function of aquatic hyphomycetes under the chronic exposure of nano-ZnO were studied, including sporulation rate and community composition of aquatic hyphomycetes, dehydrogenase and extracellular enzyme activity, pH value, litter decomposition rate and carbon and nitrogen content. After 46 days of chronic exposure, results found that nano-ZnO exhibited significant effects on the sporulation rate and community composition of aquatic hyphomycetes. *Alatospora* sporulation rate and litter decomposition rate showed a significant negative relationship, indicating that the fungus might be sensitive to nano-ZnO. However, *Anguillospora* and *Flabelliospora* showed a higher sporulation rate when exposed to nano-ZnO. In addition, chronic exposure of nano-ZnO promoted the fungal metabolic activity of organic nitrogen, but had no impact on organic carbon decomposition. Therefore, the response of aquatic hyphomycetes to nano-ZnO caused a significant difference on decomposition rate, organic carbon and nitrogen contents of leaf litter among different treatments. In conclusion, this study is expected to provide the essential foundation on the research of nano-ZnO toxicity on the ecological process.

Keywords: Nano-ZnO; aquatic hyphomycetes; leaf litter decomposition; extracellular enzyme activities

纳米材料由于具有小尺寸效应、表面效应、量子尺寸效应和宏观量子隧道效应等特性,故被广泛应用于轻工、化工、军事、医药等多个领域^[1]。随着纳米科技的飞速发展,越来越多的纳米材料被开发并投入到商业应用,如纳米银、纳米氧化锌、纳米二氧化钛、纳米氧化铈等^[2]。然而,在研发、生产及应用过程中,纳米材料的环境释放量日趋增加,对生态系统及人体健康存在潜在危害^[3]。因此,研究纳米材料的生态毒理机制对纳米材料的可持续发展及生态安全具有实际意义。

淡水生态系统是大部分生活用水、生产用水及雨水的汇集地^[4],在该系统中,水生丝状真菌在物质循环和能量流动等方面起着重要的作用。原因在于水生丝状真菌能够分泌一系列关键的胞外降解酶,作用于系统内的大分子聚合物,对有机质(如凋落物)进行降解转化,从而使其更容易被碎食性无脊椎动物进食,同时也为水生细菌提供无机营养^[5]。在此过程中,水生丝状真菌完成了将碳和能量从凋落物转移到更高营养级的生态功能。然而,水生丝状真菌极易受到外界环境压力的干扰,如营养来源、温度、酸碱度、氧气、重金属等因素的变化都有可能影响到它的代谢功能,间接地对凋落物的分解效率产生影响^[6]。研究表明,重金属锌离子和铜离子对水生丝状真菌的生长繁殖具有抑制作用,从而显著抑制了其生物活性,导致凋落物降解速率下降^[7-8]。然而,纳米材料对水生丝状真菌的影响效应却鲜有报道^[9],研究水生丝状真菌对纳米材料的响应及适应

机制将有助于更好地解释纳米材料对生态系统的环境毒理机制。

纳米氧化锌因其独特的光电性能、高效的催化能力和抗菌活性而广泛应用于陶瓷、玻璃、接合剂、涂料、电池和助燃剂等生产中,间接导致了其在水环境中具有相当程度的暴露。Nowack 课题组和 Dumont 课题组的研究^[10-11]均表明,随着纳米产品的大量应用,预计纳米氧化锌在水环境中的浓度水平将不断增加。因此,国内外研究者越来越关注纳米氧化锌对生态环境和人类健康造成的负面效应^[12-14]。基于上述分析,本课题通过室内模拟凋落物降解过程实验,探讨纳米氧化锌对水生丝状真菌的影响效应,分析纳米氧化锌在降解过程中的形态变化、运移规律及其对凋落物降解速率的影响;并对体系内水生丝状真菌生孢率及群落多样性的变化进行跟踪,探明水生丝状真菌在纳米氧化锌作用下的演替规律;结合水生丝状真菌主要降解酶活性的动态变化,进一步剖析纳米氧化锌的环境行为特征与水生丝状真菌代谢功能的内在联系,综合多重视角来揭示水生丝状真菌对纳米氧化锌的响应及适应机制,为新兴污染物的生态毒理研究提供坚实的理论基础。

1 实验材料(Experimental materials)

1.1 纳米氧化锌

实验所用 3 种粒径的纳米氧化锌(30±10 nm, 99.9%; 90±10 nm, 99.8% metals basis; 200 nm, 99.9%)均由上海阿拉丁试剂公司提供。纳米氧化锌悬浮液(6 g L⁻¹)的制备:分别称取不同粒径的纳米

氧化锌粉末,用超纯水定容,使用数控超声波清洗器(KQ-500DE,昆山舒美)在4℃、40 KHz条件下超声30 min使纳米颗粒分散均匀。在200 KV下透过电子显微镜(JEM-2010, JEOL, 日本)表征 ZnO 悬浮液的初始尺寸和形态特征(图1),其平均实际粒径分别为(15±3) nm、(50±23) nm 和 (200±21) nm。

1.2 凋落叶

实验所用凋落叶取自钻天杨(*Populus nigral* L.), 别称美杨。由于钻天杨广泛分布于河岸两边,所以选择为实验材料。凋落叶收集于2015年11月济源砚瓦河的河岸边,将其带回实验室,用去离子水把叶子清洗干净并用打孔器制成直径为12 mm的圆盘,40℃烘干至恒重(约72 h),后装入孔径为0.5 mm的凋落物袋中(每袋80片,装之前称重),实验共准备78袋。凋落物袋定植点选在济源砚瓦河某段溪流(34°56'24.73'' N, 112°25'56.15'' E, 海拔134 m, 宽度10 m)。该河段水质良好,水温18℃,电导率546 $\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$,溶解氧10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,氧化还原电位-60 μV ,其优势物种有狭叶香蒲、芦苇及狐尾藻。将凋落物袋绑紧并系到笼子里,沉浸在河水中15 d使微生物定植。为确定叶片的初始重量,在定植30 min时,随机选取3袋带回实验室烘干并称量。另外,取20 L河水低温运送至实验室用于凋落物培养。

2 实验方法 (Experimental methods)

凋落物定植完成后,将凋落物筐低温运至实验室,用纯水轻柔清洗叶子3遍后放进装有60 mL 无菌河水(121℃, 20 min)的150 mL 锥形瓶中。其中河水使用隔膜真空泵(LH-85LD, 上海昨非实验室设备有限公司)过滤^[15],并高温高压灭菌降至室温后使

用。取15瓶作为空白对照,剩余60瓶进行相应的处理,分别加入纳米氧化锌悬浮液(30、90、200 nm)1 mL,使其最终浓度达到100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[16-20]。实验采用的是室内模拟的方法,因此需早晚摇三角瓶(光照与黑暗比为12 h:12 h)并记下当时的温度和湿度,同时温度在17~18℃,为微生物提供适宜的温度,每隔7天换一次水并重新加入相同浓度的纳米氧化锌。分别在暴露0、4、10、17、27和46 d时取样,一组15个样,每个处理3个重复,随机选取,分别测定真菌生孢率、群落组成、脱氢酶活性、胞外降解酶活性、体系pH值、叶子剩余干重及碳、氮含量等各项指标。

2.1 真菌生孢率及群落组成分析

通过凋落物降解期间叶片上水生丝状真菌产生的分生孢子来评估真菌生孢率及多样性。空白组各夹取8片叶子于装有40 mL河水的锥形瓶中,高压灭菌(121℃、20 min),作为阴性对照。另从各处理组中各夹取8片叶子置于装有已灭菌河水的锥形瓶中,加入60 μL 0.5% 曲拉通溶液,放入摇床黑暗培养48 h(18℃、120 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$),诱导产生孢子。48 h后,将叶片取出并用5 μm 混合纤维素滤膜依次过滤每一个锥形瓶中的培养液,然后再用0.05% 乳酸酚棉蓝活细胞染液染色并用载玻片固定。20 min后,用400倍光学显微镜观察并记录真菌分生孢子丝、子囊、孢子形状和数量,每个样品观察20个视野^[21-22]。最后所有叶片移入烘箱40℃干燥72 h并称重,根据式(1)计算出生孢率。

$$\text{生孢率} = \frac{\text{孢子总数}}{\text{培养时间}} \quad (1)$$

其中:脱氢酶活性单位表示为个 $\cdot\text{h}^{-1}$;培养时间单位为h。

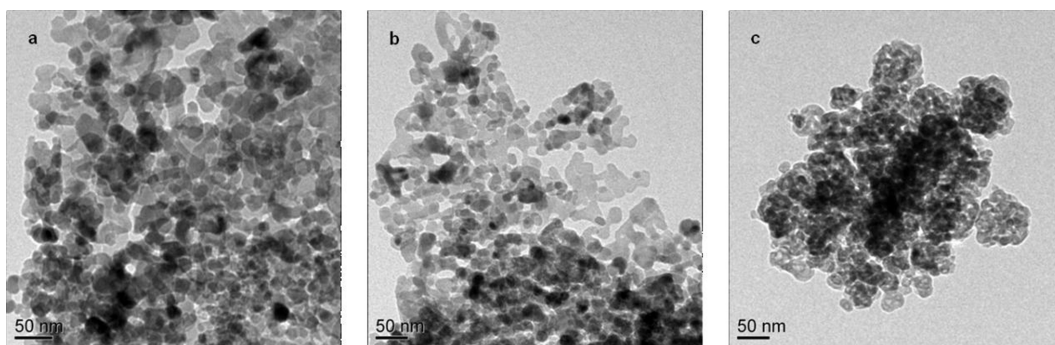


图1 纳米氧化锌悬浮液的透射电镜图

注: (a) 30 nm 氧化锌; (b) 90 nm 氧化锌; (c) 200 nm 氧化锌。

Fig. 1 Transmission electron microscopy (TEM) images of stock suspensions

Note: (a) 30 nm ZnO, (b) 90 nm ZnO, and (c) 200 nm ZnO.

2.2 脱氢酶活性

早期的研究表明脱氢酶活性与生物量之间存在正相关,脱氢酶活性可以间接反映体系内微生物的生物量^[23]。本课题根据 Hoostal 等^[24]测定脱氢酶活性的方法,测定凋落叶降解过程中的脱氢酶活性的变化来表征微生物总量的变化。每个处理取3片叶子加入0.4 mL 2,3,5 氯化三苯基四氮唑溶液(由 Tris 缓冲液配得,pH 值为7.6);在恒温培养箱中30 °C 黑暗培养24 h 后加入4 mL 丙酮,继续培养2 h,摇匀取上清液测485 nm 下的吸光度,根据式(2)计算出脱氢酶活性。

$$\text{脱氢酶活性} = CV/Dwt \quad (2)$$

其中:脱氢酶活性单位表示为 $\mu\text{g TPF} \cdot \text{g}^{-1}$ 干重;TPF 为甲臞化合物; C 为滤液中 TPF 的浓度(由标准曲线得出); V 为凋落物溶液体积; Dwt 为凋落物干重。

2.3 胞外降解酶活性

根据 Allison 实验室可见光酶标法^[25]测定8种胞外酶活性,包括酸性磷酸酶(ACP), β -葡萄糖苷酶(BG),纤维二糖水解酶(CBH),亮氨酸氨基肽酶(LAP),甘氨酸氨基肽酶(GAP),多酚氧化酶(PPO),过氧化物酶(POD)以及N-乙酰-葡萄糖苷酶(NAG)。取10片叶盘放于6 mL 醋酸钠缓冲液中在冰浴中

超声2 min 得到酶粗提取液,实验使用酶粗提取液测定胞外降解酶的活性。其测定方法见表1。

2.4 凋落物损失量及碳氮含量

将每瓶样品中的叶子用超纯水轻洗去残留的纳米氧化锌,于40 °C 烘干至恒重(约72 h),用电子天平上(精确度为0.001 g)确定最终干重,凋落叶降解速率根据式 Olson 提供的公式得出^[26]。在降解第0、27和46天时,取凋落叶样品于90 °C 烘干磨碎,用自动元素分析仪(VARIO EL III, ELeMental Analysensysteme GmbH, 德国)测凋落叶在初始、中期和末期的碳氮含量。降解微环境的酸碱度由pH计测定。

3 数据处理与分析(Data analysis)

真菌生孢率、脱氢酶活性、胞外降解酶活性、pH、凋落叶降解速率及中期和后期凋落叶的碳氮含量在各处理间的差异性用单因素方差分析;降解速率与真菌丰度之间的相关性用 Pearson 相关系数分析;以上分析用 SPSS 18.0 版软件进行了统计分析且结果在5%的显著性水平;非度量多维尺度分析(NMDS 法)用来分析不同处理间水生丝状真菌群落组成的差异性,且用 R 语言软件 3.0.2 版 vegan 安装包完成。

表1 胞外降解酶活性测定方法

Table 1 Determination method of extracellular enzyme activities

胞外酶种类 Enzyme	缩写 Abbreviation	底物 Substrate	单位 IU definition
纤维二糖水解酶 Cellobiohydrolase	CBH	4-硝基苯基- β -D-纤维二糖	每克干重凋落物每小时 释放1 μmol 对硝基苯酚
β -葡萄糖苷酶 β -glucosidase	BG	4-硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷	每克干重凋落物每小时 释放1 μmol 对硝基苯酚
N-乙酰-葡萄糖苷酶 N-acetylglucosaminidase	NAG	4-硝基苯基-2-乙酰氨基-2-脱氧- β -D-吡喃葡萄糖苷	每克干重凋落物每小时 释放1 μmol 对硝基苯酚
酸性磷酸酶 Acid phosphatase	ACP	对硝基苯磷酸二钠六水合物	每克干重凋落物每小时 释放1 μmol 对硝基苯酚
亮氨酸氨基肽酶 Leucine-aminopeptidase	LAP	L-亮氨酸-4-硝基苯胺	每克干重凋落物每小时 释放1 μmol 对硝基苯酚
甘氨酸氨基肽酶 Glycine-aminopeptidase	GAP	甘氨酸-4-硝基苯胺	每克干重凋落物每小时 释放1 μmol 对硝基苯酚
多酚氧化酶 Polyphenol oxidase	PPO	左旋多巴	每克干重凋落物每小时 释放1 μmol 左旋多巴
过氧化物酶 Peroxidase	POD	左旋多巴	每克干重凋落物每小时 释放1 μmol 左旋多巴

4 结果与讨论 (Results and discussion)

4.1 水生丝状真菌的生孢率

水生丝状真菌生孢率受处理组和降解时间的影响(图 2)。小粒径的纳米氧化锌(30 和 90 nm)在前期(前 4 d)对其具有抑制作用(图 2, $P < 0.05$)。然而,分别在第 10 天 90 nm 氧化锌和第 17 天 30 nm 氧化锌反而对生孢率起到明显的促进作用。这反映了经过一定时间的暴露,水生丝状真菌活性从响应到适应的一个过程。大粒径的纳米氧化锌(200 nm)经过 17 d 暴露使水生丝状真菌的生孢率显著低于空白组(图 2, $P < 0.05$)且在之后一直处理较低水平,说明纳米氧化锌的粒径越大,其对生态过程的抑制作用显现得越慢^[27]。

4.2 水生丝状真菌的群落组成变化

经过 46 d 的凋落叶降解,纳米氧化锌的介入使水生丝状真菌(基于属水平)群落结构产生了显著变化(图 3)。如,纳米氧化锌显著抑制了 *Astrosphaeriella*、*Margaritispora*、*Pestalotiopsis* 和 *Massarina* 在真菌群落中的比例,其中,30 nm 氧化锌对 *Margaritispora* 的抑制作用显著,90 nm 氧化锌对 *Astrosphaeriella* 的抑制作用显著,这表明,真菌群落对不同粒径的氧化锌具有不同的响应机制。相反, *Ypsilina* 和 *Flabellospora* 在群落中的比例在暴露纳米氧化锌的条件下得到显著提高,以 30 nm 和 90 nm 的氧化锌的促进效应最明显。这表明经过慢性暴露真菌种类对不同粒径的氧化锌逐渐显示出了适应效应。

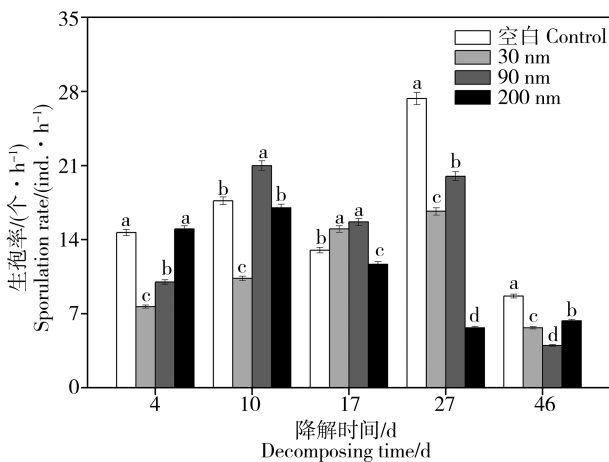


图 2 纳米氧化锌慢性暴露对水生丝状真菌生孢率的影响

Fig. 2 The impacts of nano-ZnO on aquatic fungal sporulation rate during the chronic exposure

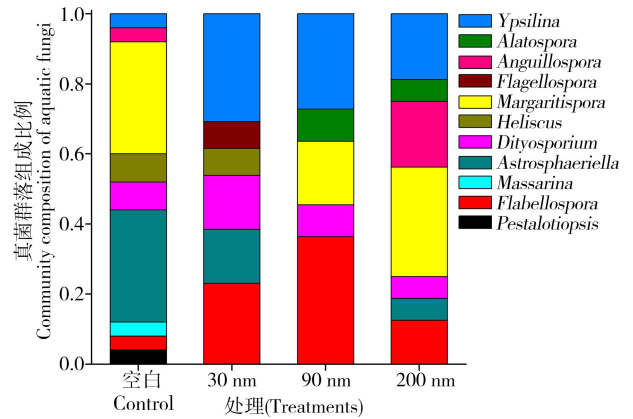


图 3 纳米氧化锌对水生丝状真菌的群落组成的影响

Fig. 3 The impacts of nano-ZnO on community composition of aquatic fungi

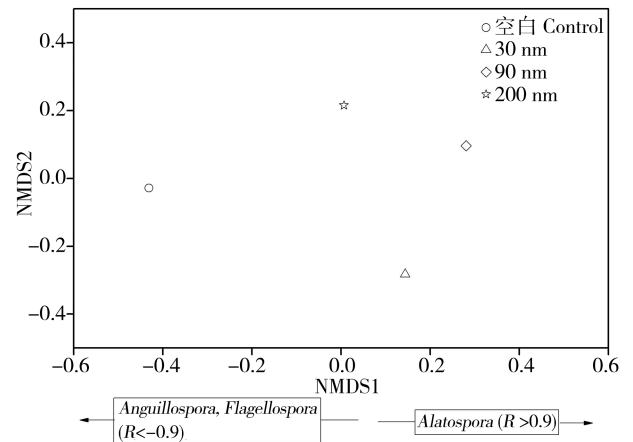


图 4 基于水生丝状真菌生孢率的非度量多维尺度 (NMDS) 群落组成在纳米氧化锌慢性暴露下的差异

Fig. 4 Non-metric multidimensional scaling (NMDS) analyses performed on sporulation rate of the fungal community present on *Populus nigra* L. leaf litter

从水生丝状真菌分生孢子数量角度分析(图 4), 得出 3 种水生丝状真菌的生物量与 NMDS1 轴有显著的相关性。其真菌生物量具有以下规律: *Alatospora* 在各处理间的生物量排序为: 空白组 < 200 nm 氧化锌 < 30 nm 氧化锌 < 90 nm 氧化锌; *Anguillospora* 和 *Flabellospora* 在各处理间的生物量排序为: 空白组 > 200 nm 氧化锌 > 30 nm 氧化锌 > 90 nm 氧化锌。这表明 *Anguillospora* 和 *Flabellospora* 的活性被纳米氧化锌显著地抑制, 且 90 nm 氧化锌抑制作用最强, 这可能是由于纳米氧化锌本身或者其释放的 Zn^{2+} 所致^[28]; 另一方面, 经过慢性暴露 *Alatospora* 的生孢率得以显著提高, 且以 90 nm 氧化锌促进作用最强。

4.3 纳米氧化锌对脱氢酶活性的影响

假设纳米氧化锌具有毒性,那么纳米氧化锌的介入将抑制凋落叶降解过程中的微生物的生物量。实验结果表明,脱氢酶活性的变化验证了这个猜想。单因素方差分析显示,纳米氧化锌对微生物的生物量具有显著的抑制作用。通过图5可以看出,纳米氧化锌暴露使脱氢酶活性在前4 d迅速降低,这与我们之前的研究结果类似^[9]。其中,30 nm 氧化锌使脱氢酶活性降低了4倍,90 nm 氧化锌降低了2倍,200 nm 氧化锌降低了3倍。对于整个降解周期来说,纳米氧化锌暴露使脱氢酶活性平均值(2.18)比空白对照组脱氢酶酶活平均值(10.40)减少了4倍。暴露在90 nm 氧化锌的凋落物脱氢酶活性的最低平均值为1.83,同期暴露在30 nm 氧化锌的凋落物脱氢酶酶活平均值为2.12,200 nm 氧化锌处理组的脱氢酶活性平均值最高为2.59(图5, $P < 0.05$)。

4.4 纳米氧化锌对胞外降解酶活性的影响

除了BG、LAP和GAP 3种胞外酶之外,纳米氧化锌的暴露显著抑制了大部分胞外酶的活性,其中

PPO和NAG在整个降解周期中都受到显著抑制,而30 nm 氧化锌却对LAP和GAP具有显著的促进作用(图6, $P < 0.05$)。研究表明,纳米氧化铜能够引起氧化应激反应,从而导致水生生物的原生质膜破

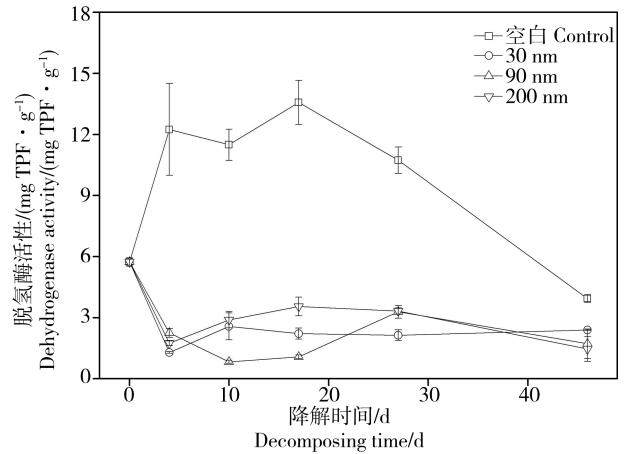


图5 纳米氧化锌慢性暴露对脱氢酶活性的影响

Fig. 5 Changes of dehydrogenase activity during chronic exposure of nano-ZnO

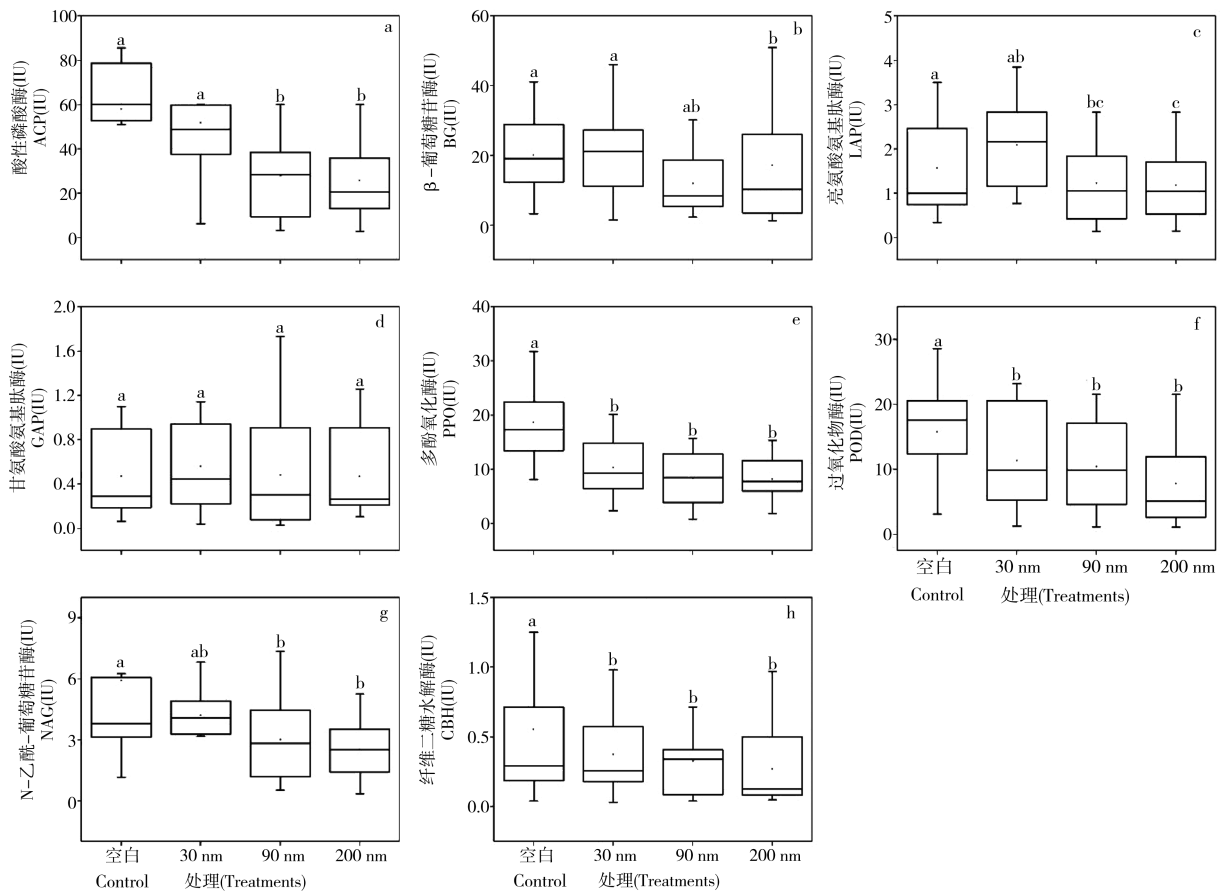


图6 纳米氧化锌对胞外降解酶活性的影响

Fig. 6 The impacts of nano-ZnO on extracellular enzymatic activities

裂,胞外酶释放受阻^[29-30]。这样看来,本研究表明纳米氧化锌对水生丝状真菌产生的胞外降解酶活性具有相似的抑制作用。然而也存在一些例外,在某些采样期间,200 nm 氧化锌处理组中 ACP、LAP、GAP、POD 活性比空白组高,这表明不同胞外酶对纳米氧化锌具有不同的响应机制。

4.5 微环境 pH 值的变化

在 46 d 的降解周期中,虽然 pH 值的变化幅度比较小。但单因素方差分析显示,纳米氧化锌的暴露使体系内 pH 值升高,其中 30 nm 和 200 nm 氧化锌处理下 pH 值显著升高(图 7, $P < 0.05$)。然而,在不同粒径氧化锌处理之间并无明显差异。经过 46 d 降解,空白组体系内 pH 均值最低为 7.52,30 nm 氧化锌处理组 pH 均值最高为 7.62,其次为 200 nm 氧化锌处理组 pH 均值为 7.59,90 nm 氧化锌处理组 pH 均值为 7.58(图 7)。有研究表明,土壤 pH 值不受纳米氧化锌介入的影响^[31],我们研究与该研究的不同结果说明了纳米氧化锌在不同介质中产生的影响效应是不同的。这是由于纳米氧化锌的环境行为(如聚集、溶解等)会随着环境介质的变化而变化^[27, 32-34]。因此,研究纳米氧化锌的环境行为有助于更好地解释其生态毒理机制^[35]。

4.6 凋落叶的降解速率

经过 46 d 的凋落叶降解,空白组的降解速率为 0.47,其显著高于纳米氧化锌处理组(图 8, $P < 0.05$),且不同粒径氧化锌处理之间也存在着显著差异(图 8, $P < 0.05$)。30 nm 和 90 nm 氧化锌处理下的降解速率(0.28 和 0.24)显著低于 200 nm 氧化锌处理下的降解速率(0.37)。该结果与纳米氧化铈、纳米氧化铜对水体凋落物降解的影响是相同的^[36-38]。由于大部分胞外酶被纳米氧化锌所抑制,直接导致水生丝状真菌对凋落叶的降解速率降低^[39]。与真菌生孢率和群落组成等指标相联系,我们发现 *Alatospora*、*Anguillospora* 和 *Flabellospora* 产生分生孢子的数量在各处理间的变化规律与凋落物降解速率具有一致性。其中,*Alatospora* 的生孢率与降解速率具有显著负相关($R = -0.982, P = 0.018$)。这表明以上 3 种水生丝状真菌在凋落叶降解过程中起到非常重要的作用,其中 *Alatospora* 对降解过程具有抑制作用,而后两者对该过程起到积极了作用。*Alatospora* 的生孢率与降解速率的显著负相关表明这种水生丝状真菌是纳米氧化锌的敏感菌,而 *Anguillospora* 和 *Flabellospora* 的生孢率在纳米氧化锌介入后显著增加,表

明这 2 种菌是纳米氧化锌的耐受菌,但需要慢性暴露才能表现出适应机制。

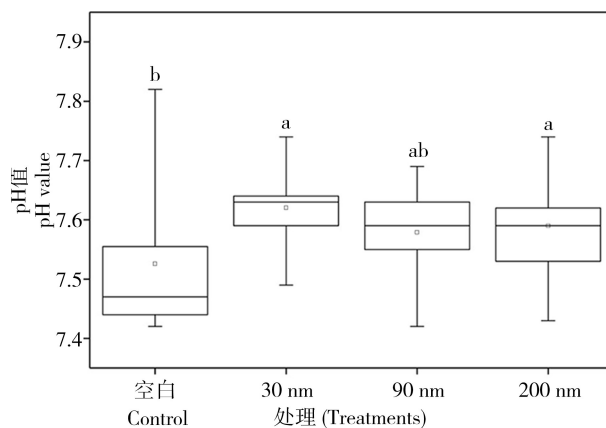


图 7 纳米氧化锌慢性暴露对凋落物降解过程中微观生态环境 pH 值的影响

Fig. 7 The effect of nano-ZnO on the pH value of microcosms environment during chronic exposure

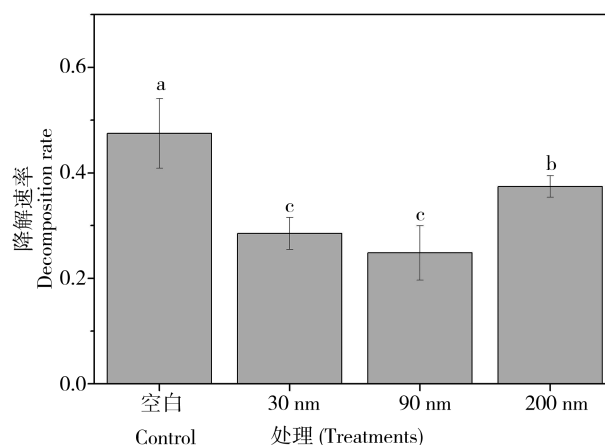


图 8 纳米氧化锌对钻天杨凋落叶降解速率的影响

Fig. 8 The impacts of nano-ZnO on the decomposition rate of *Populus nigra* L. leaves litter

4.7 凋落叶碳氮含量的变化

凋落叶降解中期,空白组凋落叶含碳量最高,之后依次是 200 nm、30 nm 和 90 nm 氧化锌处理组,这表明纳米氧化锌促进水生丝状真菌对凋落叶有机碳的降解(表 2, $P < 0.05$),但是在加入纳米氧化锌的处理组之间并无显著差异。同时,与空白组对比,对于有机氮的降解只有 90 和 30 nm 氧化锌处理组表现出显著的促进作用(表 2, $P < 0.05$)。空白组与纳米氧化锌处理组在对凋落叶碳氮比这个指标上并没有明显差异,但是 30 nm 氧化锌处理下的凋落叶碳氮

比显著高于 200 nm 氧化锌(表 2, $P < 0.05$)。这表明, 30 nm 氧化锌的介入使微生物分泌与氮相关的胞外酶相对于 200 nm 氧化锌多, 这与凋落物含氮量数据相对应。

凋落物降解末期, 90 nm 氧化锌处理下调落叶含碳量最高, 之后依次是 30 nm 氧化锌、空白组和 200 nm 氧化锌, 说明经过纳米氧化锌的慢性暴露对凋落叶中的有机碳的降解没有显著的影响, 但 90 nm 氧化锌处理下的凋落叶碳含量显著高于 200 nm 氧化锌(表 3, $P < 0.05$), 这说明长期影响下不同粒径的纳米氧化锌对水生丝状真菌有机碳的代谢功能具有差异性。空白组凋落叶含氮量显著高于纳米氧化锌处理组, 且纳米氧化锌处理组之间并无明显差异性, 这说明 200 nm 氧化锌在中期时并没有表现出对有机氮具有显著的降解作用, 但经过慢性暴露其对凋落叶中有机氮的代谢功能表现出显著的促进作用。因此, 慢性或者长期暴露对于评估纳米材料生

态毒性是非常必要的。这一点在凋落叶碳氮比这个指标上也得到了验证: 纳米氧化锌慢性暴露使末期凋落叶的碳氮比显著高于空白组, 且纳米氧化锌处理组之间并无显著差异(表 3, $P < 0.05$)。与中期碳氮比结果相比较, 表明纳米氧化锌的慢性暴露使水生丝状真菌在对有机氮的降解功能显著提高, 而对有机碳的降解功能并无明显影响, 从而使处理组的凋落叶碳氮比显著高于空白组。

参考文献 (References):

- [1] Farre M, Gajda-Schrantz K, Kantiani L, et al. Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 393(1): 81-95
- [2] Notter D A, Mitrano D M, Nowack B. Are nanosized or dissolved metals more toxic in the environment? A meta-analysis [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2014, 33(12): 2733-2739
- [3] Scown T M, Van A R, Tyler C R. Do engineered nanoparticles pose a significant threat to the aquatic environment? [J]. *Critical Reviews in Toxicology*, 2010, 40(7): 653-670
- [4] Colvin V L. The potential environmental impact of engineered nanomaterials [J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(10): 1166-1170
- [5] Krauss G J, Sole M, Krauss G, et al. Fungi in freshwaters: Ecology, physiology and biochemical potential [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2011, 35(4): 620-651
- [6] Gonçalves A L, Lirio A V, Graça M A S, et al. Fungal species diversity affects leaf decomposition after drought [J]. *International Review of Hydrobiology*, 2016, 101(1-2): 78-86
- [7] Pu G, Tong J, Su A, et al. Adaptation of microbial communities to multiple stressors associated with litter decomposition of *Pterocarya stenoptera* [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2014, 26(5): 1001-1013
- [8] Pu G, Du J, Ma X, et al. Contribution of ambient atmospheric exposure to *Typha angustifolia* litter decomposition in aquatic environment [J]. *Ecological Engineering*, 2014, 67(6): 144-149
- [9] Du J, Zhang Y, Liu L, et al. Can visible light impact litter decomposition under pollution of ZnO nanoparticles? [J]. *Chemosphere*, 2017, 187: 368-375
- [10] Gottschalk F, Sun T, Nowack B. Environmental concentrations of engineered nanomaterials: Review of modeling and analytical studies [J]. *Environmental Pollution*, 2013, 181(6): 287-300

表 2 凋落叶降解中期碳氮含量

Table 2 The content of carbon and nitrogen of *Populus nigra* L. leaf litter in the medium term of the chronic exposure

处理 Treatments	碳含量/(mg·g ⁻¹) C/(mg·g ⁻¹)	氮含量/(mg·g ⁻¹) N/(mg·g ⁻¹)	碳氮比 Ratio of C/N
空白 Control	454.3±1.7 ^a	16.5±0.2 ^a	27.59±0.34 ^{ab}
30 nm	425.6±1.0 ^b	14.9±0.3 ^b	28.59±0.55 ^a
90 nm	423.8±2.5 ^b	15.0±0.2 ^b	28.19±0.43 ^{ab}
200 nm	428.8±2.2 ^b	15.9±0.4 ^a	27.11±0.60 ^b

注: 不同字母表示各处理间存在显著性差异($P < 0.05$)。

Note: Different lowercase letter denotes significant differences ($P < 0.05$) among treatments.

表 3 凋落叶降解末期碳氮含量

Table 3 The content of carbon and nitrogen of *Populus nigra* L. leaf litter in the final term of the chronic exposure

处理 Treatments	碳含量/(mg·g ⁻¹) C/(mg·g ⁻¹)	氮含量/(mg·g ⁻¹) N/(mg·g ⁻¹)	碳氮比 Ratio of C/N
空白 Control	415.5±7.5 ^{ab}	18.9±1.2 ^a	22.16±1.01 ^b
30 nm	416.2±4.3 ^{ab}	17.1±0.3 ^b	24.34±0.62 ^a
90 nm	421.5±10.7 ^a	16.4±0.3 ^b	25.68±0.21 ^a
200 nm	397.0±0.3 ^b	15.7±0.2 ^b	25.32±0.25 ^a

注: 不同字母表示各处理间存在显著性差异($P < 0.05$)。

Note: Different lowercase letter denotes significant differences ($P < 0.05$) among treatments.

- [11] Egon D, Johnson A C, Keller V D J, et al. Nano silver and nano zinc-oxide in surface waters—Exposure estimation for Europe at high spatial and temporal resolution [J]. *Environmental Pollution*, 2015, 196: 341-349
- [12] Xu Y, Wang C, Hou J, et al. Effects of ZnO nanoparticles and Zn²⁺ on fluvial biofilms and the related toxicity mechanisms [J]. *Science of The Total Environment*, 2016, 544: 230-237
- [13] Xiao Y, Vijver M G, Chen G, et al. Toxicity and accumulation of Cu and ZnO nanoparticles in *Daphnia magna* [J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(7): 4657-4664
- [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] Ferreira V, Raposeiro P M, Pereira A, et al. Leaf litter decomposition in remote oceanic island streams is driven by microbes and depends on litter quality and environmental conditions [J]. *Freshwater Biology*, 2016, 61: 783-799
- [16] Boxall A, Tiede K, Chaudhry Q, et al. *Current and Future Predicted Exposure to Engineered Nanoparticles* [M]. York, UK: Central Science Laboratory, 2007
- [17] Gottschalk F, Sonderer T, Scholz R W, et al. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions [J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43: 9216-9222
- [18] Piccinno F, Gottschalk F, Seeger S, et al. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world [J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 2012, 14: 1-11
- [19] Pradhan A, Seena S, Pascoal C, et al. Can metal nanoparticles be a threat to microbial decomposers of plant litter in streams? [J]. *Microbial Ecology*, 2011, 62: 58-68
- [20] Batista D, Pascoal C, Cássio F. How do physicochemical properties influence the toxicity of silver nanoparticles on freshwater decomposers of plant litter in streams? [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2017, 140: 148-155
- [21] Graça M A S, Bärlocher F, Gessner M O. *Methods to Study Litter Decomposition* [M]. Springer Netherlands, 2005
- [22] Marvanova L P C, Cassio F. New and rare hyphomycetes from streams of northwest Portugal. Part I [J]. *Cryptogamie Mycologie*, 2003, 24: 339-358
- [23] Cochran V L, Elliott L F, Lewis C E. Soil microbial biomass and enzyme activity in subarctic agricultural and forest soils [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1989, 7(4): 283-288
- [24] Hoostal M J, Bidart-Bouzat M G, Bouzat J L. Local adaptation of microbial communities to heavy metal stress in polluted sediments of Lake Erie [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 65(1): 156-168
- [25] The Allison Lab. *Enzyme Assays for Fresh Litter and Soil Adapted from Bob Sinsabaugh Lab* [R/OL]. [2017-10-31]. <http://allison.bio.uci.edu/protocols>
- [26] Olson J S. Energy storage and the balance of producers and decomposers in ecological systems [J]. *Ecology*, 1963, 44(2): 322-331
- [27] Santo N, Fascio U, Torres F, et al. Toxic effects and ultrastructural damages to *Daphnia magna* of two differently sized ZnO nanoparticles: Does size matter? [J]. *Water Research*, 2014, 53(8): 339-350
- [28] Duarte S, Pascoal C, Alves A, et al. Copper and zinc mixtures induce shifts in microbial communities and reduce leaf litter decomposition in streams [J]. *Freshwater Biology*, 2010, 53: 91-101
- [29] Pradhan A, Silva C O, Silva C, et al. Enzymatic biomarkers can portray nano CuO-induced oxidative and neuronal stress in freshwater shredders [J]. *Aquatic Toxicology*, 2016, 180: 227-235
- [30] Adam N, Schmitt C, Bruyn L D, et al. Aquatic acute species sensitivity distributions of ZnO and CuO nanoparticles [J]. *Science of the Total Environment*, 2015, 526: 233-242
- [31] Rashid M I, Shahzad T, Shahid M, et al. Zinc oxide nanoparticles affect carbon and nitrogen mineralization of *Phoenix dactylifera* leaf litter in a sandy soil [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2017, 324 (Pt B): 298-305
- [32] Tripathy N, Hong T K, Ha K T, et al. Effect of ZnO nanoparticles aggregation on the toxicity in RAW 264.7 murine macrophage [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2014, 270(8): 110-117
- [33] Sávoly Z, Buzanich G, Pepponi G, et al. The fate of nano-ZnO and its bulk counterpart in the body of microscopic nematodes: An X-ray spectrometric study [J]. *Microchemical Journal*, 2015, 118: 80-87
- [34] 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 (4): 1484-1489
- [35] Li W M, Wang W X. Distinct biokinetic behavior of ZnO nanoparticles in *Daphnia magna* quantified by synthesizing ⁶⁵Zn tracer [J]. *Water Research*, 2013, 47(2): 895-902
- [36] Bour A, Mouchet F, Cadarsi S, et al. Toxicity of CeO₂

- nanoparticles on a freshwater experimental trophic chain: A study in environmentally relevant conditions through the use of mesocosms [J]. *Nanotoxicology*, 2016, 10(2): 245-255
- [37] Bour A, Mouchet F, Cadarsi S, et al. Impact of CeO₂ nanoparticles on the functions of freshwater ecosystems: A microcosm study [J]. *Environmental Science-Nano*, 2016, 3: 830-838
- [38] Pradhan A, Seena S, Schlosser D, et al. Fungi from metal-polluted streams may have high ability to cope with the oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2015, 34: 923-930
- [39] Tlili A, Jabiol J, Behra R, et al. Chronic exposure effects of silver nanoparticles on stream microbial decomposer communities and ecosystem functions [J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(4): 2447-2455 ◆