

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20201201002

杨祥宇, 邓亚宏, 石益广, 等. 综合根系活性及叶片光合速率揭示碳纳米材料对湿地中水生植物的影响[J]. 生态毒理学报, 2021, 16(6): 181-190
Yang X Y, Deng Y H, Shi Y G, et al. Comprehensive photosynthesis and enzymes analysis reveal impacts of carbon nanomaterials on wetland-plant system [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(6): 181-190 (in Chinese)

综合根系活性及叶片光合速率揭示碳纳米材料对湿地中水生植物的影响

杨祥宇^{1,2,3}, 邓亚宏⁴, 石益广⁴, 袁小兵⁴, 孙志国⁴, 何强^{1,2,3}, 陈一^{1,2,3,*}

1. 重庆大学三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆大学, 重庆 400045

2. 国家低碳和绿色建筑国际研究中心, 重庆大学, 重庆 400045

3. 重庆大学环境与生态学院, 重庆 400045

4. 中建三局第二建设工程有限责任公司, 武汉 430000

收稿日期: 2020-12-01

录用日期: 2021-01-04

摘要: 人工湿地通常被认为是去除纳米材料(nano-materials, NMs)的有效技术。然而, 湿地植物在碳纳米材料(carbon nano-materials, CNMs)胁迫下的响应尚不清楚。本研究对常见 CNMs 包括单壁碳纳米管(SWCNTs)、多壁碳纳米管(MWCNTs)和纳米富勒烯(nC_{60}) 在低($10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)和高($1\ 000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)浓度条件下暴露 5 d 和 180 d 的影响展开研究。植物体内抗氧化酶活性, 如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性出现显著变化且丙二醛(MDA)过量。此外, SWCNTs 和 MWCNTs 均明显抑制了光合速率和根系活性, 而 nC_{60} 的影响并不明显。植物生物量及主要元素(C、N、P)含量均有波动。

关键词: 碳纳米材料; 植物活性; 人工湿地; 抗氧化酶活性; 光合速率; 生物量

文章编号: 1673-5897(2021)6-181-10

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

Comprehensive Photosynthesis and Enzymes Analysis Reveal Impacts of Carbon Nanomaterials on Wetland-plant System

Yang Xiangyu^{1,2,3}, Deng Yahong⁴, Shi Yiguang⁴, Yuan Xiaobing⁴, Sun Zhiguo⁴, He Qiang^{1,2,3}, Chen Yi^{1,2,3,*}

1. Key Laboratory of the Three Gorges Region's Eco-Environment, Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400045, China

2. National Centre for International Research of Low-carbon and Green Buildings, Chongqing University, Chongqing 400045, China

3. College of Environment and Ecology, Chongqing University, Chongqing 400045, China

4. The Second Construction Engineering Co. Ltd., China Construction Third Engineering Bureau Group Co. Ltd., Wuhan 430000, China

Received 1 December 2020

accepted 4 January 2021

Abstract: Constructed wetlands (CWs) are considered as the efficient technology for the nano-materials (NMs) removal. However, the responses of wetland plants under carbon nano-materials (CNMs) stress have been unclear. Here, we investigated the differential impacts of common CNMs (SWCNTs, MWCNTs and nC_{60}) on wetland plants under 5-day and 180-day exposure to low ($10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and high ($1\ 000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) concentrations. After two exposure

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(51708056); 国家污染治理科技重大专项(2017ZX07401003-4); 重庆市青年人才计划(CQY201905062)

第一作者: 杨祥宇(1991—), 男, 博士研究生, 研究方向为人工湿地水处理技术及新型污染物毒理机制, E-mail: yangxiangyu@cqu.edu.cn

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: cheniyi8574@cqu.edu.cn

phases, as the invading substance, CNMs induced the variation of antioxidant enzyme activities (e.g., superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) activities) as well as the overproduction of malondialdehyde (MDA). Additionally, SWCNTs and MWCNTs obviously inhibited photosynthesis rate and root activity. Differently, nC_{60} had no obvious effects on photosynthesis rate and root activity under 180-day exposure. As responses the biomass and major elements (C, N and P) content of plants had a corresponding fluctuation towards CNMs stress.

Keywords: carbon nanomaterials; plants activity; constructed wetlands; antioxidant enzyme activity; photosynthetic rate; biomass

碳纳米材料(carbon nanomaterials, CNMs)因其独特的力学性能、热持久性和化学稳定性而被广泛应用于众多领域,如柔性导电复合材料^[1]、合金^[2]和混凝土^[3]等。随着含有 CNMs 的商品材料大量合成、使用和处理,CNMs 不可避免地被释放到环境中,对生态环境和人体健康造成威胁。污水处理系统作为 CNMs 进入环境的必经途径,其受影响情况尚未明确。

人工湿地作为生态友好型污水处理系统,具有结构简单、低能耗、维护方便等优点,已经越来越得到水处理行业的认可和推广^[4]。由于生物膜特殊的截留能力及纳米颗粒超大的比表面积,虽然人工湿地对常规氮磷污染物有良好的去除效果,但也被认为是纳米级颗粒污染物的重要聚集区^[5-6]。湿地植物作为人工湿地重要的组成部分,它们能直接或间接地去除湿地水体中污染物^[7],例如吸收同化氮、磷养分,富集重金属,还可有效去除废水中的有机污染物^[8]。此外,湿地植物还可以调节 pH 值,释放有机分泌物、氧气,以增强根际微生物对污染物的降解和转化^[9]。植物的景观功能也展现了湿地系统的美学价值。然而,CNMs 对湿地植物的生物毒性以及因此对湿地除污效能的影响目前还没有被充分阐明。

在响应国家“节能减排”、“创建生态友好型宜居环境”政策的大背景下,人工湿地的推广应用已成为趋势。为使人工湿地系统更好地服务城镇废水处理,在居民环境中营造更好地景观氛围。了解 CNMs 对水生植物的毒性影响十分必要。尽管之前已有关于 CNMs 对植物的生理毒性报道,但大多数 CNMs 的毒理学研究都在土壤或水培等单一处理基础上,采用较高剂量对农作物或敏感植物进行研究,不适宜说明 CNMs 在湿地废水处理这样的复杂生态系统中对大型水生植物的影响过程。因此本研究重点考察了 3 种常见 CNMs 包括单壁碳纳米管(SWCNTs)、多壁碳纳米管(MWCNTs)和纳米富勒烯

(nC_{60})在人工湿地中对植物生长的影响。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验材料(Experimental materials)

3 种碳纳米材料(CNMs)购自江苏纳米先丰(XFNANO)材料科技有限公司。实验中,SWCNTs 和 MWCNTs 被放置在 $12 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液浸泡 11 h 去除残留金属催化剂,之后用去离子水清洗直到中性^[10]。 nC_{60} 分散到甲苯中, $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡 2 h,然后加入 4 倍体积的去离子水继续振荡,直到甲苯挥发完全^[11]。随后通过 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜(ANPEL,上海,中国)。所有洗过的 CNMs 在 60°C 的烘箱中干燥过夜以得到粉末。

本实验 CNMs 浓度设置为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 以模拟环境浓度和工厂排放浓度。具体做法是将 1.2 g 的 CNMs 利用超声(25°C 、 250 W 、 40 kHz 、 0.5 h)悬浮到 100 mL 去离子水中,再分别取 1 μL 和 10 mL 添加到 12 L 人工配水中。透射电镜(TEM) (JEM-1400, JEOL, Tokyo, Japan)测定配水中 CNMs 的形态及成分组成(图 1),结果表明,本实验正式开始时,加入到反应器中的 CNMs 仍为纳米粒径且无其他毒性元素参杂,对实验结果未产生干扰。此外,配水模拟污水处理厂进水组成:化学需氧量(COD)约为 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,总氮(TN)为 $35 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,氨氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$)为 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,总磷(TP)为 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。具体配制方案如下:100 L 人工配水包含 264 mL 碳源溶液、72.6 mL 磷溶液、7.64 g 氯化铵、0.91 g 硝酸钠、2 mL 微量元素溶液。碳源溶液由 $12.89 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蛋白胨、 $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 酵母提取液、 $34 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 组成。磷溶液由 $33 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{K}_2\text{HPO}_4$ 和 $29 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$ 组成。微量元素由 $1.50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.03 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.06 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.18 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{KI}$ 、 $0.15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_3\text{BO}_3$

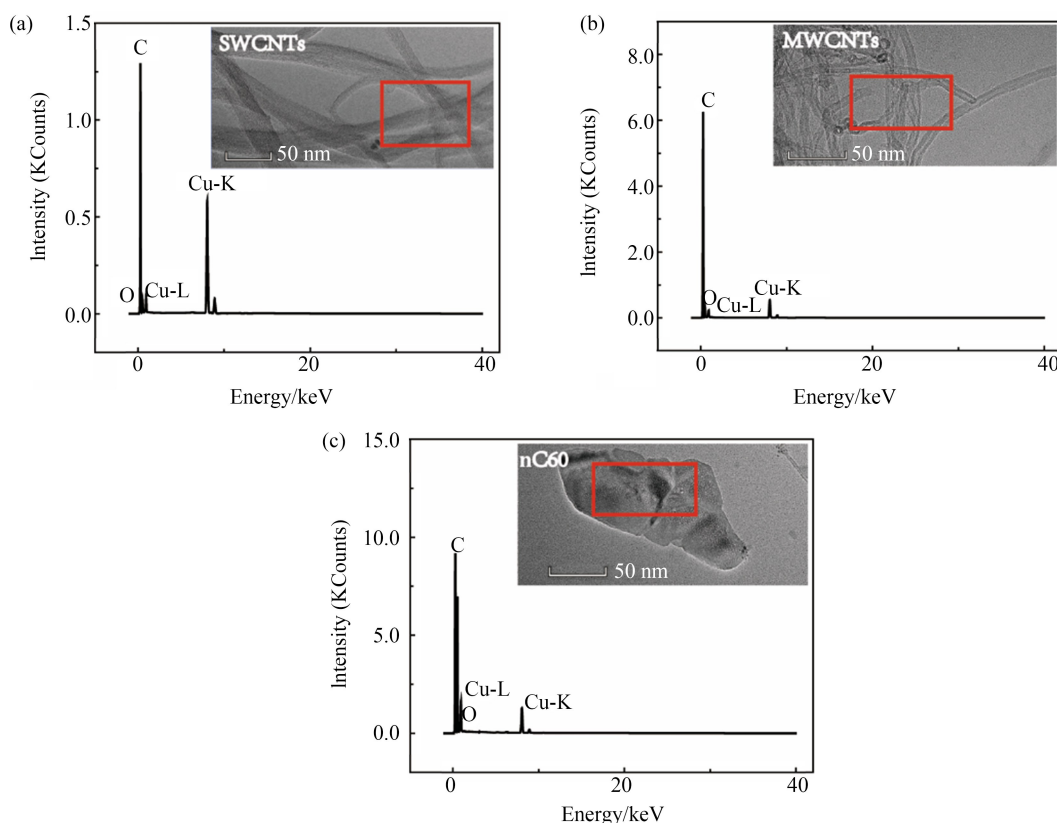


图1 人工配水中不同碳纳米材料(CNMs)的透射电镜(TEM)图像和X射线能谱(EDS)分析结果(红色矩形区域内材料的元素分布)

注:SWCNTs为单壁碳纳米管,MWCNTs为多壁碳纳米管,nC₆₀为富勒烯纳米材料。

Fig. 1 Transmission electron microscopy (TEM) images of different carbon nanomaterials (CNMs) in artificial wastewater and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) analysis results (the area indicated by the red rectangle in TEM images)

Note: SWCNTs mean single-wall carbon nanotubes; MWCNTs mean multi-wall carbon nanotubes; nC₆₀ means fullerene.

和 10 g·L⁻¹ EDTA 组成。

1.2 实验设计(Design of experiment)

本研究建立了 21 个序批次潜流人工湿地(SSF CWs),水力停留时间(HRT)为 5 d,每个湿地的体积为 0.045 m³(长 0.3 m、宽 0.3 m、高 0.5 m)。湿地内部用砾石(直径 5~8 mm,孔隙度 0.4)填充 40 cm 高,种植香蒲(约 20 cm 高,种植深度约 15 cm,密度约为 267 株·m⁻²),孔隙体积为 12 L。21 个反应器共设置 4 个体系,其中 3 个湿地为空白组,SWCNTs 组、MWCNTs 组和 nC₆₀ 组各 6 个湿地(3 个 10 μg·L⁻¹ 浓度处理组,3 个 1 000 μg·L⁻¹ 浓度处理组)。所有湿地均置于(25±1)℃的空调玻璃温室内。温室昼夜时间及温度为 18 h/6 h,28℃/22℃。温室相对光照度和湿度分别为 160 μmol·m⁻²·s⁻¹和 60%。实验开始前,湿地通入人工配水进行 4 个月的挂膜启动过程,以建立稳定的生物膜和植物根系。人工配水

从湿地顶部的入口倒入,从底部靠重力排出,停留时间为 5 d。正式实验分为短期急性暴露(5 d)和长期慢性累积(180 d)2 个阶段。

1.3 取样(Sampling)

植物样品:植物根系样品在实验开始第一批(5 d)及最后一个批次(180 d)结束后进行取样,最大程度取同深度、同粗细的根系 5 g,取出后进行酶活性、根系活力及其他项目的检测。

水样品:人工湿地反应器在实验最后一个批次开始前和结束后分别取进水和出水,根据《化学需氧量的测定(重铬酸盐法)》(GB 11914—89)进行水质测试,测试项目为 COD、TN、NH₄⁺-N 和 TP。

1.4 根系抗氧化酶活性和丙二醛分析(Analysis of antioxidant enzyme activity and malondialdehyde in root system)

取 1 g 鲜根置于预冷研钵,加少量二氧化硅颗

粒后冰浴研磨至砂浆状。加入于 5 mL 50 mmol·L⁻¹ 磷酸缓冲液(pH=7.0, 1 mmol·L⁻¹ EDTA 和 2% PVP)混匀。随后,将匀浆置于 10 mL 离心管中,4 °C、10 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,分离上清液进行抗氧化酶活性分析^[5]。

通过测定超氧化物歧化酶(SOD)抑制硝基蓝四唑(NBT)还原能力,确定 SOD 活性;根据过氧化氢分解速率确定过氧化氢酶(CAT)活性;通过测定愈创木酚的氧化速率,确定过氧化物酶(POD)的活性;通过测定硫代巴比妥酸反应物质(TBARS)的浓度,确定丙二醛(MDA)浓度。所有物质浓度均采用分光光度计(DR6000, HACH, 日本)进行确定。

1.5 光合作用、根系活力、生物量和元素分析(Photo-synthesis, root activity, biomass and elemental analysis)

实验开始后 5 d 和 180 d,中午 10:00—11:00 期间,在每个反应器中最大程度选取同高度、同大小、同状态的 3 片叶子利用光合作用仪(LI-COR 6400 XT, Licor, USA)测定净光合速率,测定过程中保证 CO₂ 浓度 400 μmol·mol⁻¹ 和光照度 450 μmol·m⁻²·s⁻¹。根活力测定采用氯化三苯基四氮唑(TTC)还原法确定,具体实验步骤参考《植物生理学实验指导》^[12]。采用电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS) (iCAP-6300-Duo, Thermo Fisher Scientific, USA)确定植物体内磷的含量,180 d 后获湿地植物,清洗根部并分离根叶,直接称量确定湿质量,烘干(75 °C, 3 d)后确定干质量,烘干后的根叶分别研磨过筛(60 目)后进行消解,消解方法参考文献[13]。采用元素分

析仪(Vario EL Cube, Elementar, Germany)对植物中 C、N 含量进行检测。

1.6 数据分析与处理(Statistical analysis)

所有处理组均设置 3 个平行,结果以平均数±标准差(Mean±SD)表示。采用方差分析(ANOVA)检验结果的显著性, $P<0.05$ 为差异有统计学意义(SPSS 22.0, IBM)。

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 根系活力的改变(Changes of root activity)

根系活力可以直接反映植物根系生长状态。如图 2 所示,实验开始 5 d 后,各组植物根系活力没有显著差别;而 180 d 后,10 μg·L⁻¹ 和 1 000 μg·L⁻¹ 的 CNMs 对根系活力产生了显著影响,分别降低了 14.6% 和 36.8% ($P<0.05$, SWCNTs 组)、7.1% 和 42.4% ($P<0.05$, MWCNTs 组)、9.9% 和 11.5% ($P<0.05$, nC₆₀ 组)。本研究揭示了 CNMs 对水生植物根系活力的抑制作用,其影响植物根系生长已有文献报道。袁刚强等^[14]发现 SWCNTs 暴露可以显著降低水稻根长耐性指数,导致根部生长缓慢。相反, Cañas 等^[15]发现 SWCNTs 在水培条件下可以促进洋葱和黄瓜的根伸长;罗春燕等^[16]发现 nC₆₀ 存在可以缓解菲对水稻根系生长的抑制作用,对植物的根系也有促进作用。关于 MWCNTs 对植物根系活力的影响,郭敏等^[17]发现水稻幼苗根系活力随 MWCNTs 浓度升高而显著降低,该结论与本研究相同。根系活力之所以受到抑制,离不开根系细胞活性的改变。

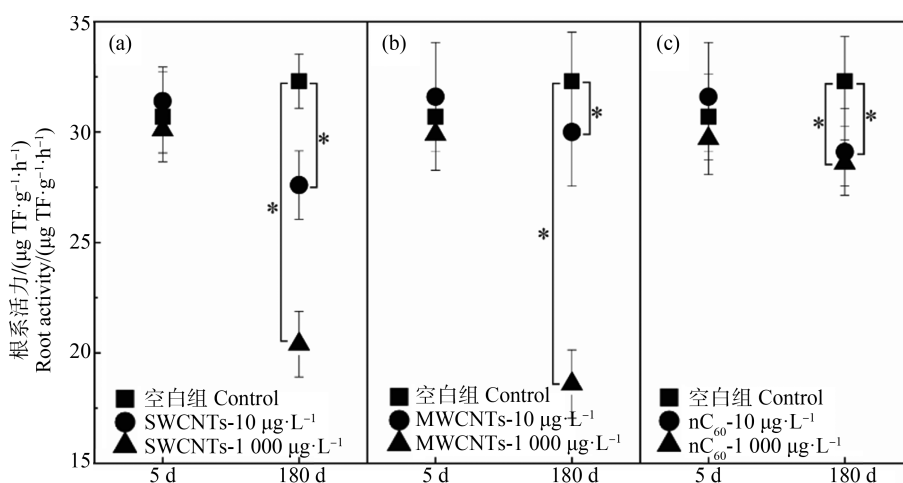


图2 CNMs 处理 5 d 和 180 d 后湿地植物根系活力的变化

注: * 表示样品间有显著性差异($P<0.05$)。

Fig. 2 Root activity of wetland plants under 5 d and 180 d exposure to CNMs

Note: * indicates values significantly different from the control over the same exposure period ($P<0.05$).

为了说明植物细胞活性的改变,本研究对根系酶活性进行了检测。

2.2 根系酶活性的变化(Changes of enzyme activity in root system)

植物处于不利条件(如干旱、淹水、重金属胁迫等)时,植物组织会产生活性氧(ROS),如超氧自由基($O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(H_2O_2)等,可抑制叶片活性^[18-19]。自由基与脂质发生过氧化反应后终产物具有细胞毒性,MDA 不仅可以指示 ROS 的生成,还可以指示细胞膜的损伤^[20]。在本研究中,实验开始 5 d 后,空白组和实验组的植物根系细胞中 MDA 含量没有显著变化,而 180 d 后,MDA 含量显著增加 13.3% ~ 54.1% ($P<0.05$, SWCNTs 组)、27.3% ~ 38.9% ($P<0.05$, MWCNTs 组)、9.3% ~ 15.2% ($P<0.05$, nC_{60} 组) (图 3)。结果说明, CNMs 导致根系细胞内自由基的产生。为了抵抗自由基的破坏性,植物可以通过提

高自身 SOD 活性,催化自由基(如 $O_2^{\cdot-}$)转化为 H_2O_2 ^[21]。本研究中,180 d 后,SWCNTs 和 MWCNTs 组根系细胞 SOD 活性分别高出空白组 1.6% ~ 13.1% 和 6.2% ~ 16.5%,而 nC_{60} 组中变化不大(图 3)。 H_2O_2 在 CAT 和 POD 这 2 种酶的催化作用下,可以得到清除,避免植物细胞遭受过氧化物的氧化损害^[21]。数据显示,实验开始 5 d 后,除 SWCNTs 组外,其他各组植物根系中 CAT 活性变化不大。180 d 后在 CNMs 高浓度处理组中, CAT 活性显著提高了 19.8% ~ 43.6% (SWCNTs 组)、12.2% ~ 34.4% (MWCNTs 组)、11.7% ~ 33.3% (nC_{60} 组)。此外,经 3 种 CNMs 处理 5 d 后,POD 活性没有显著提升,但在 180 d 的长期暴露后,各处理组 POD 活性均呈现增长趋势。根系酶含量的响应表明 CNMs 对植物根系的影响是显著存在的,同时也有力地解释了根系活力的下降。

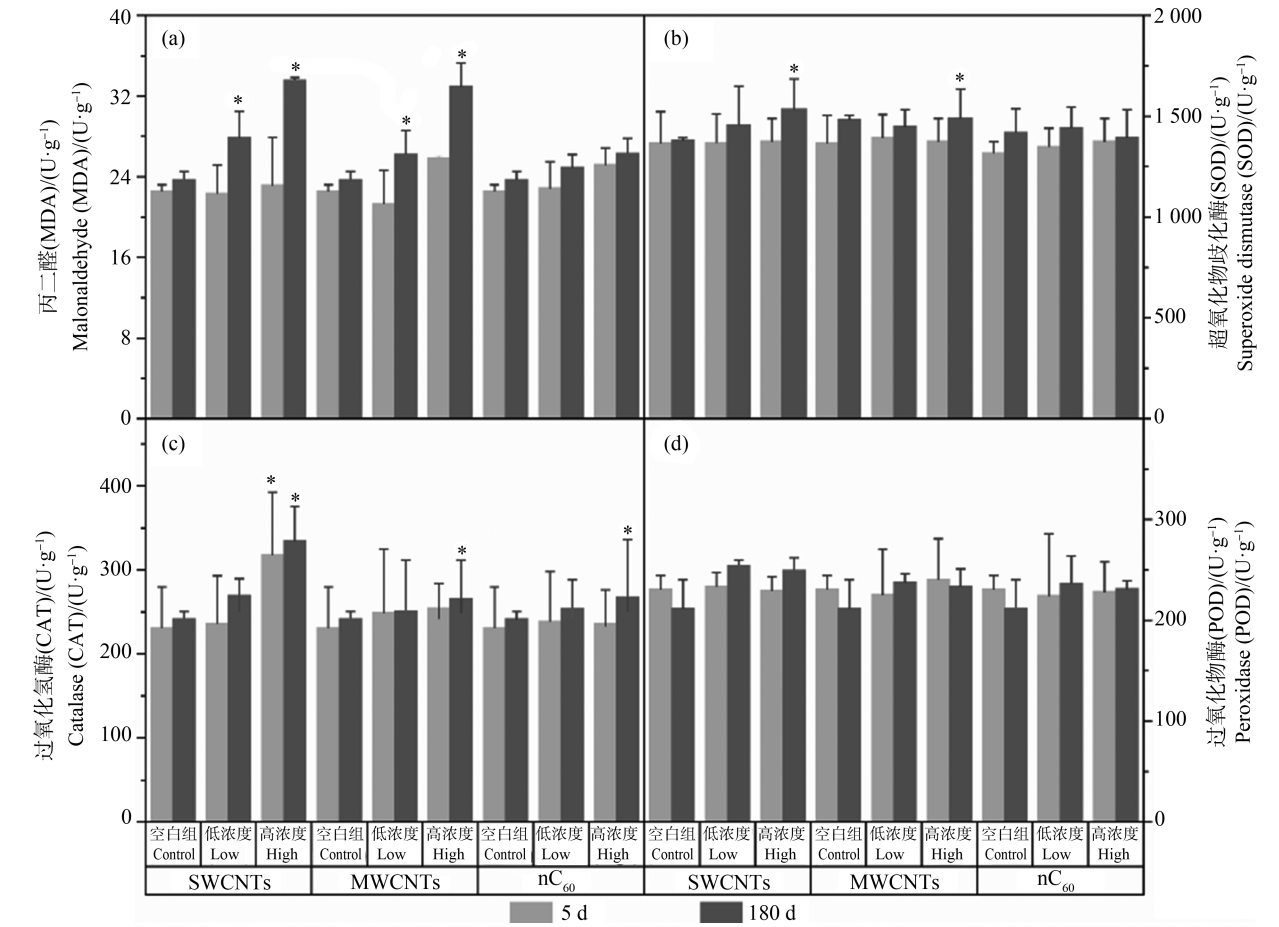


图 3 植物根系丙二醛 (MDA) 含量及抗氧化酶活性在不同浓度的 CNMs 及不同暴露时间 (5 d 和 180 d) 下的变化

注: * 表示与对照组相比,处理组样品有显著差异($n=3, P<0.05$)。

Fig. 3 The changes of malondialdehyde (MDA) and antioxidant enzyme activities in roots under different concentrations of CNMs stress after 5 d and 180 d exposure

Note: * indicates statistically significant differences ($n=3, P<0.05$) from the control.

在 CNMs 胁迫下,湿地植物体内的抗氧化酶活性增强,一方面可以反映损伤程度,另一方面可以减轻强氧化物质对湿地植物的损伤。同样,以往的研究也报道过 CNMs 的存在会导致植物中 MDA 含量的增加,并激活植物体内的抗氧化酶活性。例如,袁刚强^[22]发现 SWCNTs 胁迫下,水稻植株会产生大量 ROS,并引起体内抗氧化酶(SOD 和 CAT)活性和 MDA 含量的升高。Hao 等^[23]的研究证明水稻植株在 MWCNTs 和 nC₆₀ 的 30 d 胁迫下,根系中 SOD 和 POD 活性显著增加,该结论与本文相同。尽管类似结果被频繁报道,但诱因并没有在报道中详细介绍。根据 CNMs 的关键特性可知,其表面存在很多活性位点及空穴,当氧分子接触到其表面,在光照或其他条件下对活性位点上的氧分子进行催化即产生 O₂⁻·^[24]。O₂⁻·的产生和存在会诱发植物体内细胞的各种抗氧化反应,即抗氧化酶含量增加、活性增强,进而导致细胞增殖速率减慢甚至死亡^[25]。Lin 和 Xing^[26]观察到在 10~30 nm 的 MWCNTs 胁迫下,生菜的叶肉细胞会有凋亡的现象;Shen 等^[27]发现植物在 25 mg·L⁻¹ 浓度 1~2 nm 的 SWCNTs 培养条件下,同样显现出体细胞衰亡的现象。这些研究得出的一个共同结论是 CNMs 的存在会诱导植物细胞过量产生 ROS,进而导致细胞衰亡。

2.3 光合作用速率改变(Changes of photosynthesis rate)

光合作用被认为是植物最重要的功能之一。本

研究利用光合作用仪对净光合速率进行了检测。如图 4 所示,在实验开始 5 d 后,各组植物的净光合作用,除了 SWCNTs 组有轻微降低外(3.6%~7.0%),另外 2 组 CNMs 处理并没有显著变化。在 180 d 的实验结束后,10 μg·L⁻¹ 和 1 000 μg·L⁻¹ 的 3 种 CNMs 处理对净光合作用均有显著的抑制作用,分别下降 17.5%~52.3%(SWCNTs 组)、1.0%~47.7%(MWCNTs 组)、3.6%~17.3%(nC₆₀ 组)。相比之下,SWCNTs 的暴露对植物叶片净光合作用最显著,其次是 MWCNTs, nC₆₀ 的影响较小。

一般来说,光照度、温度等外部因素以及还原型辅酶 II (NADPH)量、Rubisco(1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶)浓度等内部因素都会影响光合效率^[28]。在本研究中,MDA 的存在表明,根系细胞膜可能被过氧化物破坏^[5]。此外,MDA 的产生过剩也会损害光合作用系统中的关键功能过程。同样, Huang 等^[29]报道,由于过量的 ROS 存在,水生植物中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)叶绿素含量和光合系统(PS II)功能、活性都会下降。考虑到 ROS 的存在,电子传递速率也随着抑制强度的增加而降低^[30]。关于 CNMs 对植物光合作用的影响,王李原^[31]研究了 MWCNTs 对芦荟和蜈蚣草的影响,发现短时间(24 h)暴露于 MWCNTs 可以促进植物的光合作用,而长时间(72 h)暴露光合作用则会受到抑制,但并没有解释产生机理。对于 nC₆₀ 影响大型水生植物光合作用的研究并不多,但是 Tao 等^[32]和 Santos 等^[33]对栅

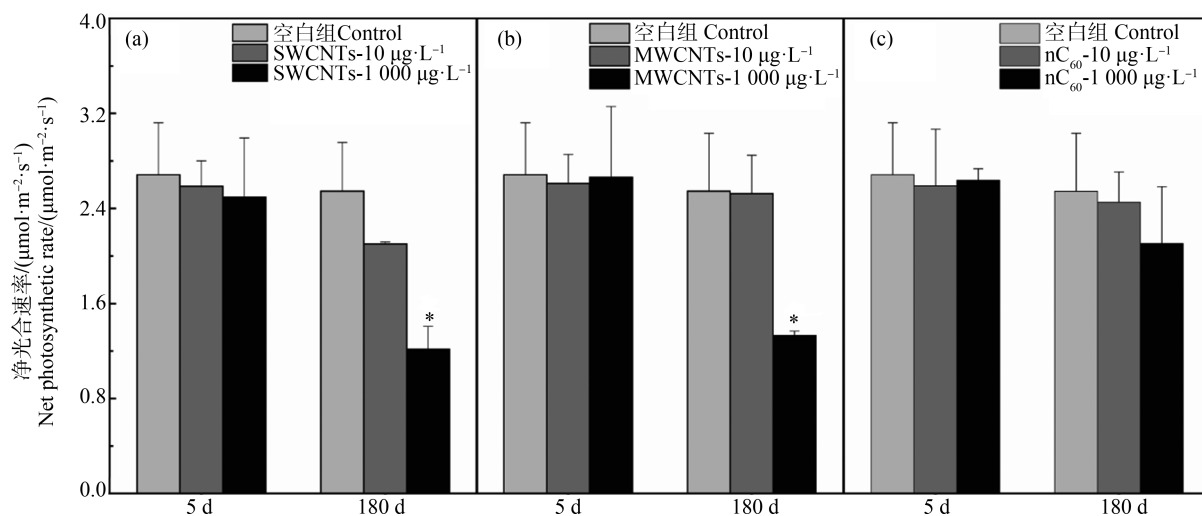


图 4 CNMs 处理 5 d 和 180 d 后湿地植物叶片净光合速率的变化

注: * 表示与对照组相比,处理组样品有显著性差异($n=3$, $P<0.05$)。

Fig. 4 Net photosynthetic rate of wetland plants under 5 d and 180 d exposure to CNMs

Note: * indicates values significantly different from the control over the same exposure period ($n=3$, $P<0.05$).

藻的研究表明, nC_{60} 会降低光合产物和叶绿素的含量, 最终造成栅藻死亡、浮萍生长受阻。因此, 对于本研究中影响叶片净光合作用程度由大到小依次是 $SWCNTs > MWCNTs > nC_{60}$, 与实验中 CNMs 诱导 MDA 产生程度相一致, 以此可以推测 CNMs 诱导植物产生过量 MDA 是导致叶片净光合作用下降的关键因素。

2.4 生物量的变化(Changes of biomass)

对于 CNMs 的暴露, 植物根叶的响应最终表达在生物量上。经过 180 d 的暴露试验后, 平均每株植物生物量情况, 如表 1 所示。由表 1 可知, 处理组大部分生物量指标含量略低于空白组。尤其值得注意的是, 经 SWCNTs 和 MWCNTs 处理 180 d 后, 植株平均总质量低于空白组 1% ~ 6%, 这样的削弱趋势也显著体现在根干质量和叶干质量上。而 nC_{60} 处理组没有植物生长量低的现象。在本实验中, 对植物体内主要元素 C、N 和 P 的含量也进行了测定, 同时计算了其占植物干质量的比例。结果显示, 与空白组相比, 在 SWCNTs 处理 180 d 后, C、N 和 P 的百分含量在低、高浓度处理组分别显著降低 8.1% 和 17.1%、17.8% 和 50.5%、14.5% 和 52.6%; MWCNTs 处理组中分别降低 0.3% 和 10.5%、21.7% 和 32.7%、20.1% 和 45.0%。不同的是, nC_{60} 组表现出了低浓度处理提升植物体内 C、N 和 P 含量(分别升

高 1.7%、8.0% 和 5.8%), 而高浓度处理则削减 3 种元素含量(分别下降 3.5%、10.0% 和 16.6%)。不同组别内植物生物量的差异充分反映了 3 种 CNMs 在湿地系统中对湿地植物生长状况的影响。结合上文提到的根部根系活力、抗氧化酶活性改变以及叶部净光合作用速率的变化等结果, 并通过分析 3 种 CNMs 对植物的作用机理, 可认定存在于废水中的 CNMs 在湿地系统中长期累积, 会显著改变湿地植物的生长状态。植物作为湿地中不可或缺的组成部分, 其根系分泌氧分子及微量有机物对根际微生物生理活性具有很好的促进作用, 借此间接影响湿地处理效能; 同时根系吸收废水中含 N、P 元素的营养盐等, 也可以直接影响湿地处理效能。不论是直接还是间接影响, 都离不开植物良好的生长状态。

2.5 湿地水处理效能变化情况(Changes of treatment efficiency of wetland system)

180 d CNMs 暴露实验中反应器水处理效能的变化情况如表 2 所示。在所有反应器中, COD 的去除率均无显著变化, 这说明 CNMs 的胁迫并没有因为危害到湿地植物的生长而影响到湿地系统 COD 去除效果。对于反应器脱氮效能, 在空白组中, NH_4^+-N 去除率稳定保持在 72.1% 左右。而在 CNMs 处理组中, 180 d 的 CNMs 处理显著影响了 NH_4^+-N 去除率。相对于空白组, 在 SWCNTs 低、高浓度处理

表 1 湿地处理含 CNMs 人工废水 180 d 后湿地植物生物量指标变化
Table 1 Changes of plant biomass index in wetland system after treating artificial wastewater containing CNMs for 180 d

	空白组	SWCNTs		MWCNTs		nC_{60}	
	Control	10 $\mu g \cdot L^{-1}$	1 000 $\mu g \cdot L^{-1}$	10 $\mu g \cdot L^{-1}$	1 000 $\mu g \cdot L^{-1}$	10 $\mu g \cdot L^{-1}$	1 000 $\mu g \cdot L^{-1}$
总质量/g	565.7±10.3	559.1±8.2	530.2±12.4	563.9±15.4	557.5±11.5	571.9±9.8	572.3±16.7
Total content/g							
含水率/%	73.5±0.3	73.1±0.4	73.5±0.4	73.7±0.3	74.8±0.3	73.7±0.1	74.4±0.1
Moisture content/%							
总干质量/g	149.9±3.9	150.4±7.2	140.5±1.2	148.3±6.7	140.5±2.8	150.4±9.1	146.5±8.1
Total dry mass/g							
根部干质量/g	28.1±1.0	26.1±0.2	23.7±0.01	26.2±1.2	29.1±1.6	29.8±1.0	27.1±1.0
Root dry mass/g							
叶部干质量/g	121.8±0.1	124.3±0.1	116.8±0.1	122.1±0.2	111.4±0.2	120.6±0.1	119.4±0.1
Leaf dry mass/g							
C/%	40.1±2.3	36.8±4.5 *	33.2±2.8 *	40.0±4.5	35.9±3.8 *	40.8±4.1	38.7±2.9
N/%	5.4±1.2	4.5±0.2 *	2.7±0.1 *	4.2±1.2 *	3.6±1.6 *	5.9±1.0	4.9±1.0
P/%	1.1±0.1	0.9±0.1	0.5±0.1	0.9±0.2	0.6±0.2	1.1±0.1	0.9±0.1

注: 数据以平均值±标准差表示, $n=3$; * 表示与对照组相比, 处理组样品有显著性差异($P<0.05$)。

Note: The data presents as the mean±standard deviation, $n=3$; * indicate statistical differences ($P<0.05$) from the control.

表 2 不同浓度 CNMs 处理 176 ~ 180 d 水质各指标去除效率变化

Table 2 Changes in removal efficiency of each nutrient at 176 ~ 180 d after treatment with different concentrations of CNMs

(%)

	空白组	SWCNTs		MWCNTs		nC ₆₀	
	Control	10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
COD	76.5±1.3	83.1±2.2	74.1±1.8	78.2±3.1	77.2±2.7	77.0±4.1	76.4±2.6
NH ₄ ⁺ -N	72.1±1.7	68.4±1.1	46.4±2.5 *	61.8±1.4 *	53.7±2.5 *	73.3±3.1	63.2±1.6 *
TN	73.7±2.1	69.9±1.6	51.1±2.7 *	61.7±2.4 *	49.3±1.2 *	72.9±3.1	65.9±1.8 *
TP	6.2±0.1	5.7±0.3	5.1±0.4	5.6±0.1	5.5±0.2	6.2±0.4	6.0±0.7

注:数据以平均数值±标准偏差表示, $n=3$; * 表示样品间有显著性差异($P<0.05$); COD 表示化学需氧量, NH₄⁺-N 表示氨氮, TN 表示总氮, TP 表示总磷。

Note: The data presents as the mean±standard deviation, $n=3$; * indicate statistical differences ($P<0.05$) from the control; COD represents chemical oxygen demand, NH₄⁺-N represents ammonia, and TP represents total phosphorus.

组中, NH₄⁺-N 去除率分别下降了 5.1% 和 35.6%; 在 MWCNTs 处理组中, 分别下降了 14.3% 和 25.5%; 而 nC₆₀ 处理组并没有表现出显著的下降, TN 的去除情况与 NH₄⁺-N 基本一致。对于 TP 的去除, 人工湿地的结构性质(不排泥且反应器基本长期处于缺氧状态)决定了其对污水中 TP 的去除效果不理想。在本研究中, 所有组的 TP 去除率均保持在 6.0% 左右, 同样没有受到 CNMs 的长期累积的影响而显著变化。

水生植物是人工湿地中不可缺少的组成部分, 其健康情况也直接影响人工湿地中营养盐的去除。CNMs 胁迫降低了植物体内碳氮磷 3 种大量元素的百分含量(表 1), 这也间接说明 CNMs 投加导致了植物对碳氮磷养分吸收同化能力的降低, 从而削弱了湿地的除污能力。

本研究调查了香蒲在人工湿地连续处理含有 3 种 CNMs 废水的短期和长期响应规律。结果表明, 香蒲急性(5 d)接触 CNMs 并没有显著的生理活性方面的改变; 连续处理含 CNMs 废水 180 d(慢性暴露)后, 香蒲根系细胞受 CNMs 胁迫, 胞内抗氧化酶活性及 MDA 含量升高, 导致根系活力受到显著抑制, 抑制程度由强到弱依次为 SWCNTs>MWCNTs>nC₆₀; 根部 MDA 含量增加以及抗氧化酶活性上升, 说明 CNMs 与香蒲根系长期接触, 干扰了根系细胞生理活性, 这种干扰在 SWCNTs 组和 MWCNTs 组尤为突出, 而 nC₆₀ 处理组与空白组比较并没有统计学上的显著差异。同时, 本实验证明, 由于根部遭到 CNMs 的干扰, 香蒲地上部叶片的净光合作用也表现出下降趋势。暴露于含 CNMs 的废水 180 d 后,

由于香蒲生理活性的改变, 其生物量严重减少, SWCNTs 组和 MWCNTs 组最为显著, nC₆₀ 处理组表现为短期轻微促进、长期抑制的结果。

通讯作者简介: 陈一(1985—), 男, 博士, 研究员, 主要研究方向为人工湿地氮循环与污染控制、生态毒理学。

参考文献 (References):

- [1] 苟巧林, 李燕, 李宏章, 等. 碳纳米管复合亚麻纤维柔性传感材料的制备[J]. 复合材料学报, 2021, 38(7): 2244-2253
Gou Q L, Li Y, Li H Z, et al. Preparation of flexible sensing material of flax fiber combined carbon nanotubes [J]. Acta Materiae Compositae Sinica, 2021, 38(7): 2244-2253 (in Chinese)
- [2] 吕娜. 基于纳米流体润滑的钛合金车削刀具磨损研究[J]. 机电工程, 2020, 37(10): 1231-1235
Lv N. Wear of titanium alloy turning tool based on nano-fluid lubrication [J]. Journal of Mechanical & Electrical Engineering, 2020, 37(10): 1231-1235 (in Chinese)
- [3] 唐光生, 王峰. 硫酸盐与冻融循环耦合作用下碳纳米管掺量对混凝土力学性能和微观结构的影响[J]. 水力发电, 2020, 46(11): 131-135
Tang G S, Wang F. Effect of carbon nanotubes content on mechanical properties and microstructure of concrete exposed to the coupling action of sulfate and freeze-thaw cycles [J]. Water Power, 2020, 46(11): 131-135 (in Chinese)
- [4] Lopardo C R, Zhang L, Mitsch W J, et al. Comparison of nutrient retention efficiency between vertical-flow and floating treatment wetland mesocosms with and without biodegradable plastic [J]. Ecological Engineering, 2019,

- 131: 120-130
- [5] Hu X B, Liu X B, Yang X Y, et al. Acute and chronic responses of macrophyte and microorganisms in constructed wetlands to cerium dioxide nanoparticles: Implications for wastewater treatment [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 348: 35-45
- [6] Yang X Y, Chen Y, Liu X B, et al. Influence of titanium dioxide nanoparticles on functionalities of constructed wetlands for wastewater treatment [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 352: 655-663
- [7] Choudhury M I, Segersten J, Hellman M, et al. Importance of plant species for nitrogen removal using constructed floating wetlands in a cold climate [J]. *Ecological Engineering*, 2019, 138: 126-132
- [8] Vymazal J. Removal of nutrients in constructed wetlands for wastewater treatment through plant harvesting—Biomass and load matter the most [J]. *Ecological Engineering*, 2020, 155: 105962
- [9] Lodge K A, Tyler A C. Divergent impact of grazing on plant communities of created wetlands with varying hydrology and antecedent land use [J]. *Wetlands Ecology and Management*, 2020, 28(5): 797-813
- [10] Hai R T, Wang Y L, Wang X H, et al. Impacts of multi-walled carbon nanotubes on nutrient removal from wastewater and bacterial community structure in activated sludge [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e107345
- [11] Yang X Y, He Q, Guo F C, et al. Impacts of carbon-based nanomaterials on nutrient removal in constructed wetlands: Microbial community structure, enzyme activities, and metabolism process [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 401: 123270
- [12] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 5版. 北京: 高等教育出版社, 2006: 57-61
- [13] 杨祥宇. 纳米二氧化钛对人工湿地水处理系统的影响机制研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2018: 27
- Yang X Y. Impacts mechanism of titanium oxidation nanoparticles on functionalities of constructed wetlands [D]. Chongqing: Chongqing University, 2018: 27 (in Chinese)
- [14] 袁刚强, 龚继来, 曾光明. 单壁碳纳米管材料对水稻幼苗的毒性效应[J]. *环境科学学报*, 2015, 35(12): 4143-4149
- Yuan G Q, Gong J L, Zeng G M. Phytotoxicity of single-walled carbon nanotubes to rice seedling (*Oryza sativa* L.) [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2015, 35(12): 4143-4149 (in Chinese)
- [15] Cañas J E, Long M, Nations S, et al. Effects of functionalized and nonfunctionalized single-walled carbon nanotubes on root elongation of select crop species [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2008, 27(9): 1922
- [16] 罗春燕, 徐文冰, 陈红春, 等. 胶体富勒烯与非对水稻发芽及幼苗生长的影响[J]. *环境化学*, 2016, 35(5): 1076-1083
- Luo C Y, Xu W B, Chen H C, et al. Effect of nC₆₀ colloids and phenanthrene on germination and seedling growth of rice [J]. *Environmental Chemistry*, 2016, 35(5): 1076-1083 (in Chinese)
- [17] 郭敏, 龚继来, 曾光明. 多壁碳纳米管对水稻幼苗的植物毒性研究[J]. *生态毒理学报*, 2016, 11(5): 94-102
- Guo M, Gong J L, Zeng G M. Comprehensive phytotoxicity assessment of multi-wall carbon nanotubes on rice seedlings [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2016, 11(5): 94-102 (in Chinese)
- [18] Ali M, Cheng Z H, Ahmad H, et al. Reactive oxygen species (ROS) as defenses against a broad range of plant fungal infections and case study on ROS employed by crops against *Verticillium dahliae* wilts [J]. *Journal of Plant Interactions*, 2018, 13(1): 353-363
- [19] Qi J S, Song C P, Wang B S, et al. Reactive oxygen species signaling and stomatal movement in plant responses to drought stress and pathogen attack [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2018, 60(9): 805-826
- [20] Pan C R, Bao Y Y, Guo A Y, et al. Environmentally relevant-level CeO₂ NP with ferrous amendment alters soil bacterial community compositions and metabolite profiles in rice-planted soils [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(31): 8172-8184
- [21] Zhao S L, He L, Lu Y F, et al. The impact of modified nano-carbon black on the earthworm *Eisenia fetida* under turfgrass growing conditions: Assessment of survival, biomass, and antioxidant enzymatic activities [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2017, 338: 218-223
- [22] 袁刚强. 单壁碳纳米管材料(SWCNTs)对水稻的植物毒性效应的研究[D]. 长沙: 湖南大学, 2015: 37-50
- Yuan G Q. Single-walled carbon nanotubes phytotoxicity to rice seedling (*Oryza sativa* L.) [D]. Changsha: Hunan University, 2015: 37-50 (in Chinese)
- [23] Hao Y, Yu F F, Lv R, et al. Carbon nanotubes filled with different ferromagnetic alloys affect the growth and development of rice seedlings by changing the C:N ratio and plant hormones concentrations [J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0157264
- [24] 朱丹丹, 周启星. 功能纳米材料在重金属污染水体修复中的应用研究进展[J]. *农业环境科学学报*, 2018, 37(8): 1551-1564

- Zhu D D, Zhou Q X. A review on the removal of heavy metals from water using nanomaterials [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2018, 37(8): 1551-1564 (in Chinese)
- [25] Tan X M, Lin C, Fugetsu B. Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on suspension rice cells [J]. Carbon, 2009, 47(15): 3479-3487
- [26] Lin D H, Xing B S. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth [J]. Environmental Pollution, 2007, 150(2): 243-250
- [27] Shen C X, Zhang Q F, Li J, et al. Induction of programmed cell death in *Arabidopsis* and rice by single-wall carbon nanotubes [J]. American Journal of Botany, 2010, 97(10): 1602-1609
- [28] Mellor S B, Vavitsas K, Nielsen A Z, et al. Photosynthetic fuel for heterologous enzymes: The role of electron carrier proteins [J]. Photosynthesis Research, 2017, 134(3): 329-342
- [29] Huang J, Cheng J P, Yi J. Impact of silver nanoparticles on marine diatom *Skeletonema costatum* [J]. Journal of Applied Toxicology, 2016, 36(10): 1343-1354
- [30] Queiroz A M, Mezacasa A V, Graciano D E, et al. Quenching of chlorophyll fluorescence induced by silver nanoparticles [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2016, 168: 73-77
- [31] 王李原. 碳纳米纤维/碳纤维快速分析光质对植物激素的影响[D]. 延吉: 延边大学, 2019: 19-29
- Wang L Y. Rapid analysis the effects of light quality on plant hormones by carbon nanofibers/carbon fibers [D]. Yanji: Yanbian University, 2019: 19-29 (in Chinese)
- [32] Tao X J, Yu Y X, Fortner J D, et al. Effects of aqueous stable fullerene nanocrystal (nC₆₀) on *Scenedesmus obliquus*: Evaluation of the sub-lethal photosynthetic responses and inhibition mechanism [J]. Chemosphere, 2015, 122: 162-167
- [33] Santos S M A, Dinis A M, Rodrigues D M F, et al. Studies on the toxicity of an aqueous suspension of C₆₀ nanoparticles using a bacterium (gen. *Bacillus*) and an aquatic plant (*Lemna gibba*) as *in vitro* model systems [J]. Aquatic Toxicology, 2013, 142-143: 347-354 ◆