

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20220927001

许秀松, 李亚婕, 尹勇, 等. 3种纳米材料对水稻幼苗生理及根际细菌群落结构的影响[J]. 生态毒理学报, 2023, 18(5): 266-280

Xu X S, Li Y J, Yin Y, et al. Effects of three nanomaterials on physiology and rhizosphere bacterial community structure of rice seedlings [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2023, 18(5): 266-280 (in Chinese)

3种纳米材料对水稻幼苗生理及根际细菌群落结构的影响

许秀松^{1,2,3}, 李亚婕^{1,2,3}, 尹勇^{1,2,3}, 蒙爱萍^{1,2,3}, 陈振翔^{1,2,3}, 刘灵^{1,2,3,*}

1. 珍稀濒危动植物生态与环境保护教育部重点实验室(广西师范大学), 桂林 541006
2. 广西漓江流域景观资源保育与可持续利用重点实验室, 广西师范大学, 桂林 541006
3. 广西师范大学生命科学学院, 桂林 541006

收稿日期: 2022-09-27 录用日期: 2022-12-09

摘要: 随着纳米技术的快速发展, 评估人工纳米材料(ENMs)对植物-微生物系统的潜在危害至关重要。本研究通过盆栽试验, 分析不同浓度(0、0.50、1.00 和 2.00 mg·g⁻¹)的纳米材料即纳米二氧化硅(nSiO₂)、纳米二氧化钛(nTiO₂)和纳米氧化锌(nZnO)对水稻幼苗生理和根际细菌群落结构的影响。研究结果显示, 3种纳米材料处理后, 水稻幼苗的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性均显著增加($P < 0.05$, 下同), 可溶性蛋白(SP)含量仅在 2.00 mg·g⁻¹ nTiO₂ 和 0.50 mg·g⁻¹ nZnO 处理时显著降低; 2.00 mg·g⁻¹ nSiO₂ 处理及 1.00 mg·g⁻¹ 和 2.00 mg·g⁻¹ nZnO 处理均可显著降低水稻幼苗的株高(PH)、鲜质量(FW)和干质量(DW), nTiO₂ 处理则对其没有显著性影响。高通量测序结果表明, 与不加纳米材料的对照(CK)处理比, 3种纳米材料处理的根际土壤优势菌门为变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)和拟杆菌门(Bacteroidetes), 根际促生及反硝化细菌如芽孢杆菌属(*Bacillus*)、黄色土壤菌(*Flavisolibacter*)、*Kaistobacter*、*Rhodoplanes* 和 *Candidatus Solibacter* 菌属的丰度均有显著提升。Pearson 相关分析表明, *Catellatospora* 等属的相对丰度与水稻的抗氧化酶活性和生物量呈显著正相关, 而 *Candidatus Koribacter* 等属的相对丰度与其呈显著负相关。同时, nSiO₂ 和 nZnO 处理浓度分别为 1.00 mg·g⁻¹ 和 2.00 mg·g⁻¹ 的水稻根际土壤细菌多样性均降低, 群落结构变化明显, 而 nTiO₂ 处理对其影响不显著; nSiO₂ 和 nTiO₂ 处理均诱导水稻根际细菌中编码氨基酸代谢等基因丰度显著升高, nZnO 处理则降低与细胞运动等相关功能基因丰度。综上所述, 3种尺度相同的纳米材料可直接对水稻幼苗产生生理毒性, 但因 nZnO 和 nTiO₂ 的水力直径分别为最小和最大而相应表现出最强和最弱的毒性效应。此外, 3种纳米材料尤其是 nSiO₂ 和 nZnO 还可通过改变根际土壤细菌基因功能, 降低水稻根际土壤细菌多样性并改变群落组成及结构, 间接造成水稻幼苗氧化应激和渗透胁迫, 进而不同程度地影响幼苗生长和发育, 其中 nZnO 的抑制效果最显著。3种纳米材料对水稻幼苗生理和根际细菌群落表现出的毒性大小顺序: nZnO > nSiO₂ > nTiO₂。本研究结果为纳米材料对水稻及根际土壤微生物的潜在危害及农田生态系统的环境保护与资源利用提供了科学依据。

关键词: 纳米材料; 水稻; 氧化应激; 根际细菌群落结构; 功能预测

文章编号: 1673-5897(2023)5-266-15 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effects of Three Nanomaterials on Physiology and Rhizosphere Bacterial Community Structure of Rice Seedlings

Xu Xiusong^{1,2,3}, Li Yajie^{1,2,3}, Yin Yong^{1,2,3}, Meng Aiping^{1,2,3}, Chen Zhenxiang^{1,2,3}, Liu Ling^{1,2,3,*}

基金项目: 广西创新驱动发展专项基金项目(桂科 AA20161002-2); 广西自然科学基金联合资助培育项目(2018GXNSFAA138001); 中央引领地方科技发展专项(桂科 ZY19049001); 广西重点研发计划项目(桂科 AB21220057)

第一作者: 许秀松(1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物生态学, E-mail: 1798299550@qq.com

*** 通信作者 (Corresponding author),** E-mail: liuling@mailbox.gxnu.edu.cn

1. Key Laboratory of Ecology of Rare and Endangered Species and Environmental Protection (Guangxi Normal University), Ministry of Education, Guilin 541006, China
2. Guangxi Key Laboratory of Landscape Resources Conservation and Sustainable Utilization in Lijiang River Basin, Guangxi Normal University, Guilin 541006, China
3. College of Life Sciences, Guangxi Normal University, Guilin 541006, China

Received 27 September 2022 **accepted** 9 December 2022

Abstract: With the rapid development of nanotechnology, it is critical to assess the potential harm of artificial nanomaterials (ENMs) on plant-microbial systems. In this study, the effects of different concentrations (0, 0.50, 1.00 and 2.00 mg·g⁻¹) of nanomaterials such as nanometer silica, nanometer titanium peroxide and nanometer zinc oxide (nSiO₂, nTiO₂ and nZnO) on the physiological characteristics and rhizosphere bacterial community structure of rice seedlings were analyzed by pot experiments. The results showed that the activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) in rice seedlings increased significantly after the treatment of three nanomaterials ($P < 0.05$, the same below), and the soluble protein (SP) content significantly decreased only when treated with 2.00 mg·g⁻¹ nTiO₂ and 0.50 mg·g⁻¹ nZnO. The treatment of 2.00 mg·g⁻¹ nSiO₂ and 1.00 mg·g⁻¹ and 2.00 mg·g⁻¹ nZnO significantly reduced plant height (PH), fresh weight (FW) and dry weight (DW) of rice seedlings, while nTiO₂ treatment had no significant effects on PH, FW and DW of rice seedlings. The results of high-throughput sequencing showed that compared with the control (CK), the dominant phyla were Proteobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi and Bacteroidetes, and the abundances of plant growth promoting bacteria and denitrifying bacteria such as *Bacillus*, *Flavisolibacter*, *Kaistobacter*, *Rhodoplanes* and *Candidatus Solibacter* significantly increased in the rhizosphere soil treated with three kinds of nanomaterials. Pearson correlation analysis showed that the relative abundances of *Catellatospora* and other genera were significantly positively correlated with the antioxidant enzyme activity and the biomass of rice seedlings, while the relative abundances of *Candidatus_Koribacter* and other genera were significantly negatively correlated with it. At the same time, the bacterial diversity decreased and the community structure changed significantly in rice rhizosphere soil treated with 1.00 mg·g⁻¹ nSiO₂ or 2.00 mg·g⁻¹ nZnO, but nTiO₂ treatment had no significant effect on it. The treatment with nSiO₂ or nTiO₂ significantly increased the abundance of genes related to amino acid metabolism in rice rhizosphere bacteria, while nZnO treatment decreased the abundance of functional genes related to cell movement. In conclusion, three nanomaterials with the same size can directly produce physiological toxicity to rice seedlings. However, nZnO and nTiO₂ showed the strongest and the weakest toxic effects due to the smallest and the largest hydraulic diameters respectively. Three kinds of nanomaterials, especially nSiO₂ and nZnO, indirectly caused oxidative stress and osmotic stress, and affected the growth and development of rice seedlings by changing gene function, reducing the diversity and changing the community structure in bacteria from rice rhizosphere soil. Among them, nZnO had the strongest inhibitory effect. The order of the toxicity of three nanomaterials to physiological functions of rice seedlings and bacterial community in the rhizosphere was as follow: nZnO > nSiO₂ > nTiO₂. The results of this study provided a scientific basis to reveal the potential damage of nanomaterials to rice and microorganisms in rhizosphere soil, and conduct the environmental protection and resource utilization of farmland ecosystem.

Keywords: nanomaterials; rice; oxidative stress; rhizosphere bacterial community structure; functional prediction

纳米材料是指结构单元尺寸在三维空间内至少有一维处于纳米尺度范围(1 ~ 100 nm)或由该尺度范围的物质为基本结构单元所构成的材料的总称。随着纳米技术快速发展及人工纳米材料(engineered nanomaterials, ENMs)的不断生产和应用, ENMs 通

过农业生产、地表水、大气沉积和工业排放进入环境^[1]。由于 ENMs 在湿地系统、农田以及固体废弃物土壤中迁移能力较差, 导致其在土壤中的累积水平高于大气或水体环境^[2]。现有研究表明, 土壤中的 ENMs 破坏植物的不同组织, 影响光合作用和养

分吸收,导致植物不能正常生长^[3]。Yang 等^[4]发现 2 000 mg·L⁻¹纳米氧化铜(nCuO)和纳米氧化锌(nZnO)可显著抑制玉米和水稻的根系伸长率。Yoon 等^[5]还发现 nZnO 降低大豆的根系生物量。此外,纳米材料在植物中的毒性还可表现为导致其生理紊乱,如光合作用和气体交换属性降低、氧化应激和抗氧化酶活性降低^[6]。Servin 等^[7]在研究纳米二氧化钛(nTiO₂)处理黄瓜时发现,其叶片过氧化氢酶(CAT)活性增加,而抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性降低。Shaw 等^[8]的研究得到不同结果,nCuO 处理可提高大麦芽中超氧化物歧化酶(SOD)、APX 和谷胱甘肽还原酶(GR)的活性,并降低脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)和单脱氢抗坏血酸还原酶(MDAR)的活性。

人工纳米材料不仅影响植物正常的生长发育,还可以改变植物根际土壤微生物群落的组成^[9-10],通过降低微生物量来改变土壤微生物群落或功能性细菌群落的丰度^[11-12]。纳米材料的毒性包括纳米颗粒物尺度的影响和溶解金属离子的毒性(包括细胞外溶解和胞内溶解)。徐辰^[13]研究发现,nCuO 颗粒物的毒性可造成水稻根际细菌群落多样性和群落演替的下降,在很大程度上降低了根际土壤微生物生态系统的稳定性。伍玲丽等^[14]发现,银纳米材料(nAg)暴露下土壤固氮微生物种类减少,降低了厌氧黏细菌属、流行杆菌属、假单胞菌属和慢生根瘤菌属的相对丰度。McGee 等^[15]的研究还发现较低浓度的 nAg 可显著降低土壤总脱氢酶和脲酶活性。现有研究表明,nZnO 可通过 ROS 机制破坏细菌细胞膜而表现出抗菌活性^[16],不同浓度 nZnO 处理后细菌群落结构发生演替,且降低了土壤微生物量、改变细菌的群落组成^[17-18]。在 nTiO₂ 短期暴露下,人工湿地中 α -变形菌纲和硝化螺旋菌纲等优势菌种相对丰度显著降低,影响人工湿地中细菌群落组成和多样性^[19]。

水稻是世界上最重要的粮食作物之一,近年来人工纳米材料对水稻的潜在毒性受到广泛关注。因水稻种植规模巨大,对粮食安全意义重大^[20],评估人工纳米材料对水稻的毒性效应对人类健康至关重要。本研究通过盆栽试验,分析 3 种纳米材料即纳米二氧化硅(nSiO₂)、纳米二氧化钛(nTiO₂)和纳米氧化锌(nZnO)在不同浓度下对水稻幼苗生理和根际细菌群落组成、结构、多样性及功能基因的影响,以期农田生态系统的环境保护与资源利用提供科学依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 试验材料

试验使用 3 种纳米材料:纳米二氧化硅(nSiO₂)、纳米二氧化钛(nTiO₂)、纳米氧化锌(nZnO),以上 3 种纳米材料均由皓锡纳米科技(上海)有限公司提供。其透射电镜(TEM)图见图 1(由皓锡纳米科技有限公司提供),具体性质如表 1 所示。试验水稻种子为广西农业科学院水稻所提供的桂育 3 号。供试土壤采自广西桂林会仙湿地水稻田(东经 110°11'59",北纬 25°05'11"),采集 5~20 cm 深度的土壤,室内风干,去除杂质,过 2 mm 筛备用。

1.2 试验设计

水稻幼苗试验参考文献[21],设置空白对照(CK, 0 mg·g⁻¹)与 3 种浓度(0.50、1.00 和 2.00 mg·g⁻¹)的二氧化硅、二氧化钛和氧化锌纳米材料(nSiO₂、nTiO₂ 和 nZnO)共 10 个处理,每处理 3 个重复,共 30 盒。具体处理方式如下:选取颗粒饱满、大小相近的水稻种子,用 10% H₂O₂ 浸泡 10 min 进行表面消毒,用无菌去离子水多次冲洗,再用无菌去离子水浸种 12 h。每种纳米材料称取 0.50、1.00 g 和 2.00 g 分别加入 400 mL 无菌水中,采用超声波细胞破碎仪在 400 W 条件下超声分散 20 min,得到纳米材料悬浮液。将 400 mL 的纳米悬浮液加入到 1 kg 供试土壤中,边加边混匀,即得到 3 种浓度(0.50、1.00 和 2.00 mg·g⁻¹)的纳米材料土壤,空白对照土壤则加入 400 mL 无菌水混匀。每份土壤 1 kg,共制备 30 份,将 30 份土壤分别装入 30 个培养盒(培养盒规格:18 cm×13 cm×6 cm)。将已浸种的水稻种子种入上述 30 盒土壤中,每盒 12 穴,每穴 3 粒。置于智能人工气候培养箱培养 30 d,模拟自然光照(光照 14 h,黑暗 10 h),温度 25 ℃,湿度 65%~75%。每隔 3 d,每盒加入 100 mL 含相应浓度的纳米材料的 Hoagland 营养液(其制备方法与上述纳米材料悬浮液制备方法一致),空白对照加 100 mL Hoagland 营养液。每天更换培养盒位置,保持培养条件一致。

1.3 试验方法

1.3.1 抗氧化酶液提取与测定

称取 30 d 苗龄的新鲜水稻幼苗叶片 0.50 g,用剪刀剪碎放入预冷研钵中,加入 1 mL 预冷的 0.10 mol·L⁻¹ PBS 缓冲液(pH 7.8)和少许石英砂,冰浴研磨成匀浆后再加入 7 mL PBS 缓冲液充分清洗研钵,匀浆液转入 10 mL 离心管,于 4 ℃、4 000 r·min⁻¹离心 10 min。所得上清液即为待测酶的粗提

液,可供测超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和可溶性蛋白(SP)。SOD 活性测定采用氮蓝四唑(NBT)光还原法,POD 活性测定采用愈创木酚法,CAT 活性测定采用紫外吸收法,SP 含量测定采用考马斯亮蓝法。以上各指标测定均参考李合生^[22]实验方法。

1.3.2 16S rDNA 高通量测序

参照抖落法^[23]收集水稻幼苗的根际土壤。将根际土壤送往华大基因进行 DNA 提取和高通量测序分析。称取 0.30 g 新鲜土壤,使用 DNA 提取试剂盒(PowerMag Soil DNA Isolation Kit)从每个土壤样品提取总群落 DNA。提取的总群落 DNA 通过酶标仪测定其是否合格,含量合格并保存-20 ℃ 备用。采用带 Barcode 的特异测序引物 341F 和 806R 进行 PCR 扩增,扩增产物用核酸纯化试剂盒 Agencourt AMPure XP 磁珠纯化并溶于 Elution Buffer,完成文库构建。最后使用 Illumina 公司 Miseq PE300 测序仪进行双端测序,测序读长为 2×300 bp。采取窗口法过滤,剩余高质量的 Clean data 使用序列拼接软件 FLASH 进行拼接,得到有效 Tags。利用软件 USEARCH 以 97% 的一致性进行 Tags 聚类为一个 OTUs(operational taxonomic units),将 OTUs 序列与数据库 Greengene 比对进行物种注释。采用 PICRUS2

(v2.2.0-b)软件对土壤中微生物功能与代谢途径进行预测分析。

1.4 数据处理分析

采用 R 软件(R-3.3.1)、Excel 2021 对数据进行统计分析,利用 SPSS 21.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan 多重比较,用 R 软件和 Origin 8.5 软件作图。

2 结果(Results)

2.1 种纳米材料对水稻幼苗生理的影响

如图 2(a)所示,与 0 mg·g⁻¹对照(CK)处理相比,0.50 mg·g⁻¹和 2.00 mg·g⁻¹ nSiO₂ 处理及 0.50 mg·g⁻¹ nTiO₂ 处理的 SOD 活性均显著升高($P<0.05$,下同),最高为 CK 处理的 1.35 倍。nZnO 处理的 SOD 活性随处理浓度增大而呈现先下降再升高的趋势,在 2.00 mg·g⁻¹ nZnO 处理后,水稻幼苗 SOD 活性显著增加。如图 2(b)所示,3 种浓度的 nSiO₂ 处理和 nZnO 处理的 POD 活性均显著增加,随 nZnO 浓度增加 POD 活性呈明显上升趋势,2.00 mg·g⁻¹处理的 POD 活性为 CK 处理的 1.36 倍。0.50 mg·g⁻¹ nTiO₂ 处理的 POD 活性最高,为 CK 处理的 1.44 倍,而 1.00 mg·g⁻¹和 2.00 mg·g⁻¹ nTiO₂ 处理组的 POD 活性略有上升($P>0.05$)。

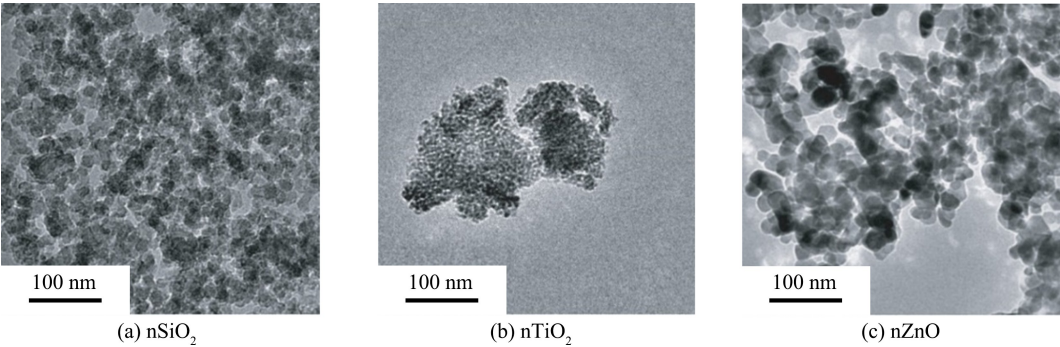


图 1 3 种纳米材料的 TEM 图

Fig. 1 The TEM images of three nanomaterials

表 1 3 种纳米材料基本信息

Table 1 Basic information on the three nanomaterials

名称	粒径/nm	纯度/%	Zeta 电位/mV	水力直径/nm
Name	Size/nm	Purity/%	Zeta potential/mV	Hydraulic diameter /nm
nSiO ₂	20	99.9	-24.8±1.6	396
nTiO ₂	5	99.9	-7.4±1.0	712
nZnO	20	99.9	-13.3±0.4	220

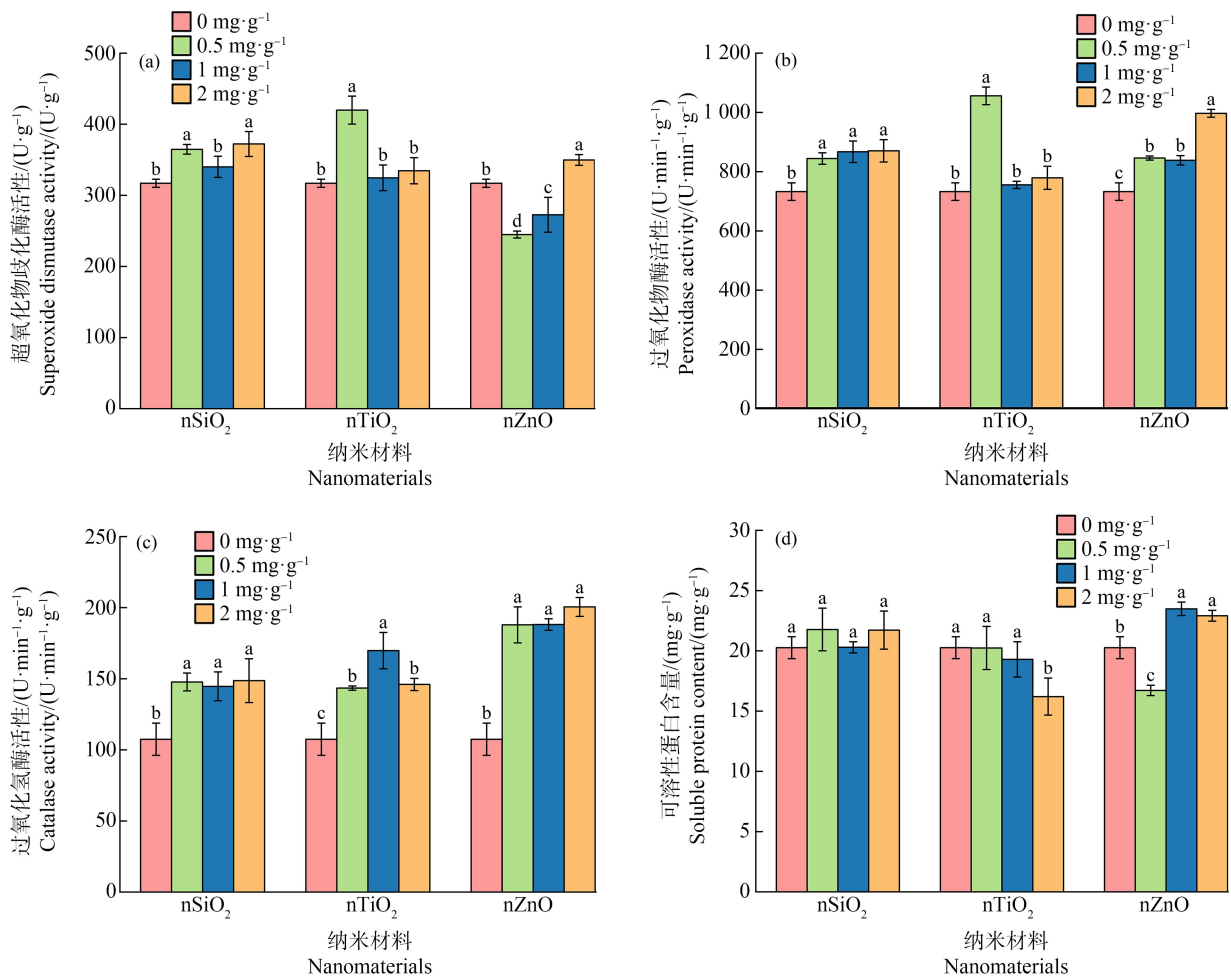


图2 3种纳米材料对水稻幼苗生理的影响

Fig. 2 Effects of three nanomaterials on the physiology of rice seedlings

如图2(c)所示, nSiO₂处理和nTiO₂处理的CAT活性分别为CK处理的1.34倍~1.38倍、1.33倍~1.58倍。nZnO处理对水稻幼苗的CAT活性的促进作用最显著,其变化范围在CK处理的1.75倍(0.50 mg·g⁻¹)和1.87倍(2.00 mg·g⁻¹)之间。如图2(d)所示, nSiO₂处理的SP含量没有显著变化。nTiO₂处理的SP含量随着纳米材料浓度升高而呈下降趋势,在2.00 mg·g⁻¹处达到最低。0.50 mg·g⁻¹ nZnO处理降低水稻幼苗SP含量, 1.00 mg·g⁻¹和2.00 mg·g⁻¹的nZnO处理显著提高SP含量。

3种纳米材料对水稻幼苗生物量的影响如表2所示, 0.50 mg·g⁻¹ nZnO处理可显著增加水稻幼苗株高(PH)和鲜质量(FW), 而2.00 mg·g⁻¹ nSiO₂处理及1.00 mg·g⁻¹和2.00 mg·g⁻¹ nZnO处理均可显著降低水稻幼苗的株高、鲜质量和干质量(DW)。nTiO₂处理则对水稻幼苗鲜质量和干质量没有显著性影响。

2.2 3种纳米材料对根际土壤细菌群落结构的影响

2.2.1 根际土壤细菌群落的物种组成

细菌群落物种组成分析如图3(a)所示, 在门水平主要分属于11个门, 其中变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)和拟杆菌门(Bacteroidetes)为10个处理水稻根际土壤的优势细菌门, 分别占比24.31%~31.36%、21.75%~30.28%、10.60%~15.90%和4.58%~11.35%。3种纳米材料处理中一部分物种相对丰度呈现显著变化, 在不同程度上提高了放线菌门(Actinobacteria)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、变形杆菌门和未定菌门(TM7)的相对丰度。与CK处理比, 仅在3个浓度上nSiO₂处理可提高土壤拟杆菌门和芽单胞菌门的相对丰度, 其相对丰度增高至5.02%。nTiO₂处理的变形杆菌门相对丰度大幅度升高至31.36%。nZnO处理则明显降低酸杆菌门、拟杆菌门、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)和疣微菌门(Verrucomicrobia)的相

表 2 3 种纳米材料对水稻幼苗生物量的影响

Table 2 Effects of three nanomaterials on the biomass of rice seedlings

纳米材料	浓度/(mg·g ⁻¹)	株高/cm	鲜质量/mg	干质量/mg
Nanomaterials	Concentrations/(mg·g ⁻¹)	Plant height/cm	Fresh weight/mg	Dry weight/mg
nSiO ₂	0	35.10±1.60a	460.83±64.40a	90.40±5.15a
	0.50	34.87±1.61a	459.97±108.56a	93.03±17.18a
	1.00	34.98±1.45a	458.20±16.69a	89.80±1.67a
	2.00	32.60±0.70b	410.83±25.91a	76.33±4.76b
nTiO ₂	0	35.10±1.60a	460.83±64.40a	90.40±5.15a
	0.50	33.73±0.72b	457.23±59.01a	86.73±8.96a
	1.00	35.47±0.93a	510.20±30.05a	93.03±5.86a
	2.00	35.00±1.41a	503.73±36.60a	91.37±5.31a
nZnO	0	35.10±1.60b	460.83±64.40b	90.40±5.15a
	0.50	38.53±0.49a	575.83±76.86a	101.67±21.15a
	1.00	30.90±0.30c	419.53±9.04b	83.17±11.72c
	2.00	31.57±0.40c	433.87±6.51b	86.33±3.54b

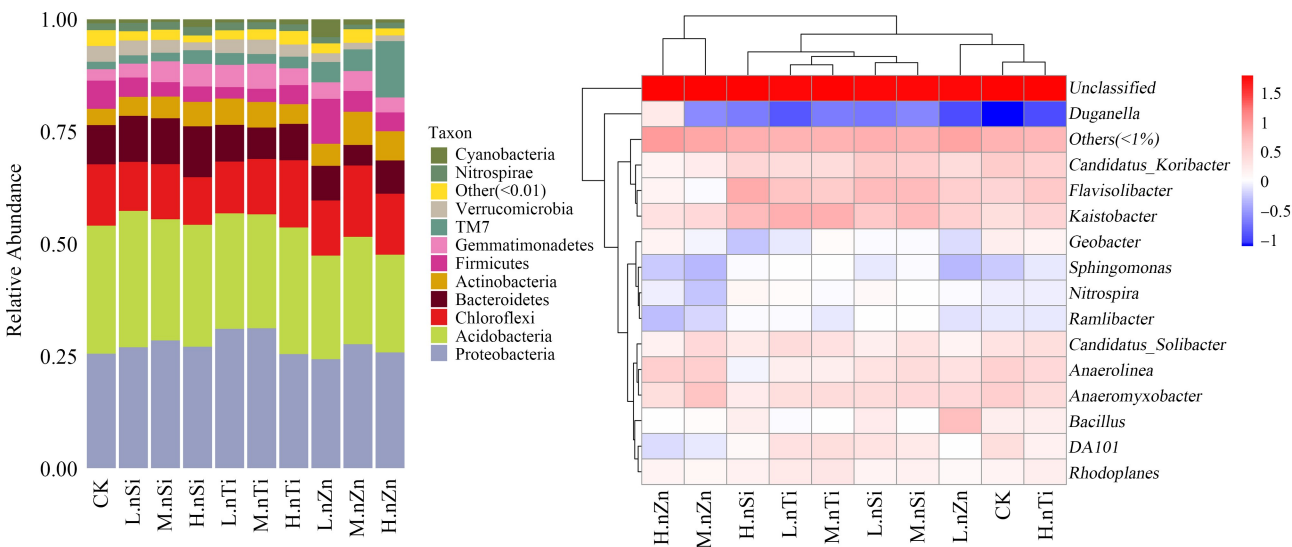


图 3 3 种纳米材料处理后水稻根际土壤细菌群落组成 (门水平) 及相对丰度热图 (属水平)

注:(a) 群落组成;(b) 相对丰度热图;L 为 0.50 mg·g⁻¹,M 为 1.00 mg·g⁻¹,H 为 2.00 mg·g⁻¹;nSi 为 nSiO₂,nTi 为 nTiO₂,nZn 为 nZnO。

Fig. 3 The composition of rhizosphere soil bacterial community (phylum level) and heat map of relative abundance (genus level) in rice treated with three nanomaterials

Note: (a) Community composition map; (b) Relative abundance heatmap; L stands for 0.50 mg·g⁻¹; M stands for 1.00 mg·g⁻¹; H stands for 2.00 mg·g⁻¹; nSi stands for nSiO₂; nTi stands for nTiO₂; nZn stands for nZnO.

对丰度,而 2.00 mg·g⁻¹ nZnO 处理的酸杆菌门和疣微菌门分别降低 6.75% 和 2.23%,1.00 mg·g⁻¹ nZnO 处理的拟杆菌门丰度降低 4.16%。

选取所有处理水稻根际土壤中相对丰度排列位于前 15 且注释信息已知的细菌属,从物种和样品双角度构建分层聚类。从图 3(b)可见,CK 处理与 0.50 mg·g⁻¹ nZnO 和 2.00 mg·g⁻¹ nTiO₂ 处理的细菌群落结构较为相似且聚为一类,0.50 mg·g⁻¹ nZnO 处理

的芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 丰度比 CK 处理高 237.00%。浓度为 0.50 mg·g⁻¹ 和 2.00 mg·g⁻¹ nTiO₂ 处理以及 3 种浓度的 nSiO₂ 处理聚为一类,优势菌属为 *Candidatus Koribacter* 属、*Kaistobacter* 属、黄色土源菌(*Flavisolibacter*)属和厌氧黏菌属(*Anaeromyxobacter*),*Flavisolibacter* 属和 *Kaistobacter* 属的丰度分别比 CK 处理高 22.83% ~ 128.00% 和 36.86% ~ 221.58%。1.00 mg·g⁻¹ 和 2.00 mg·g⁻¹ nZnO 处理的

细菌群落结构聚为一类,其优势属为 *Candidatus Solibacter*、*Kaistobacter* 属、厌氧菌属 (*Anaerolinea*) 和厌氧黏菌属。nZnO 处理出现局部菌属颜色较深的结果,并且与 CK 处理距离较远。

2.2.2 根际土壤细菌多样性指数及群落差异分析

通过 Chao1、Ace、Shannon 和 Simpson 指数来表示细菌群落的 α 多样性。如图 4 所示,与 CK 处理比,nTiO₂ 处理的水稻根际土壤细菌群落的上述 4 个指数均无显著变化 ($P>0.05$,下同),说明 nTiO₂ 对土壤细菌群落丰富度及多样性的影响不显著。1.00 mg·g⁻¹ 和 2.00 mg·g⁻¹ nSiO₂ 处理的 Shannon 指数明显下降(图 4(c)) ($P<0.05$),Simpson 指数显著上升(图 4(d))。随着 nSiO₂ 浓度增加,显著降低水稻根际土壤细菌 α 多样性。与 CK 处理相比,nZnO 处理的 Chao1 和 Ace 指数均降低,但随着其浓度增加 Shannon 指数先升后降,Simpson 指数则相反,在高浓度 nZnO 处理时差异显著。

β 多样性指数可表明 2 个微生物群落物种多样性之间的差异,相异系数(CV)值越大,表示这 2 个群落物种多样性存在的差异越大。由图 5(a)可知,随着 nSiO₂ 浓度增大,与 CK 处理之间的 CV 值有不同程度升高。聚类分析发现,2.00 mg·g⁻¹ nSiO₂ 处理聚成一支,与 CK 处理的 CV 值达 0.42;0.50 mg·g⁻¹ nTiO₂ 处理单独聚成一支且与 CK 处理无交叉点(图 5(b)),CV 值为 0.34,而 2.00 mg·g⁻¹ nTiO₂ 处理与 CK 处理聚集在一支,两者差异不显著。随着 nZnO 浓度升高,与 CK 处理之间的 CV 值逐渐增大(图 5(c)),且 CK 处理单独聚成一支,3 种浓度 nZnO 处理与 CK 处理的细菌群落物种多样性差异较大,尤其是 1.00 mg·g⁻¹ 和 2.00 mg·g⁻¹ 的 nZnO 处理,CV 值分别达到 0.40 和 0.50。与 CK 处理比,nZnO 处理在 3 种纳米材料处理间差异最大,显著影响根际土壤细菌群落物种多样性。

基于加权 UniFrac 距离度量的主坐标分析(PCoA),

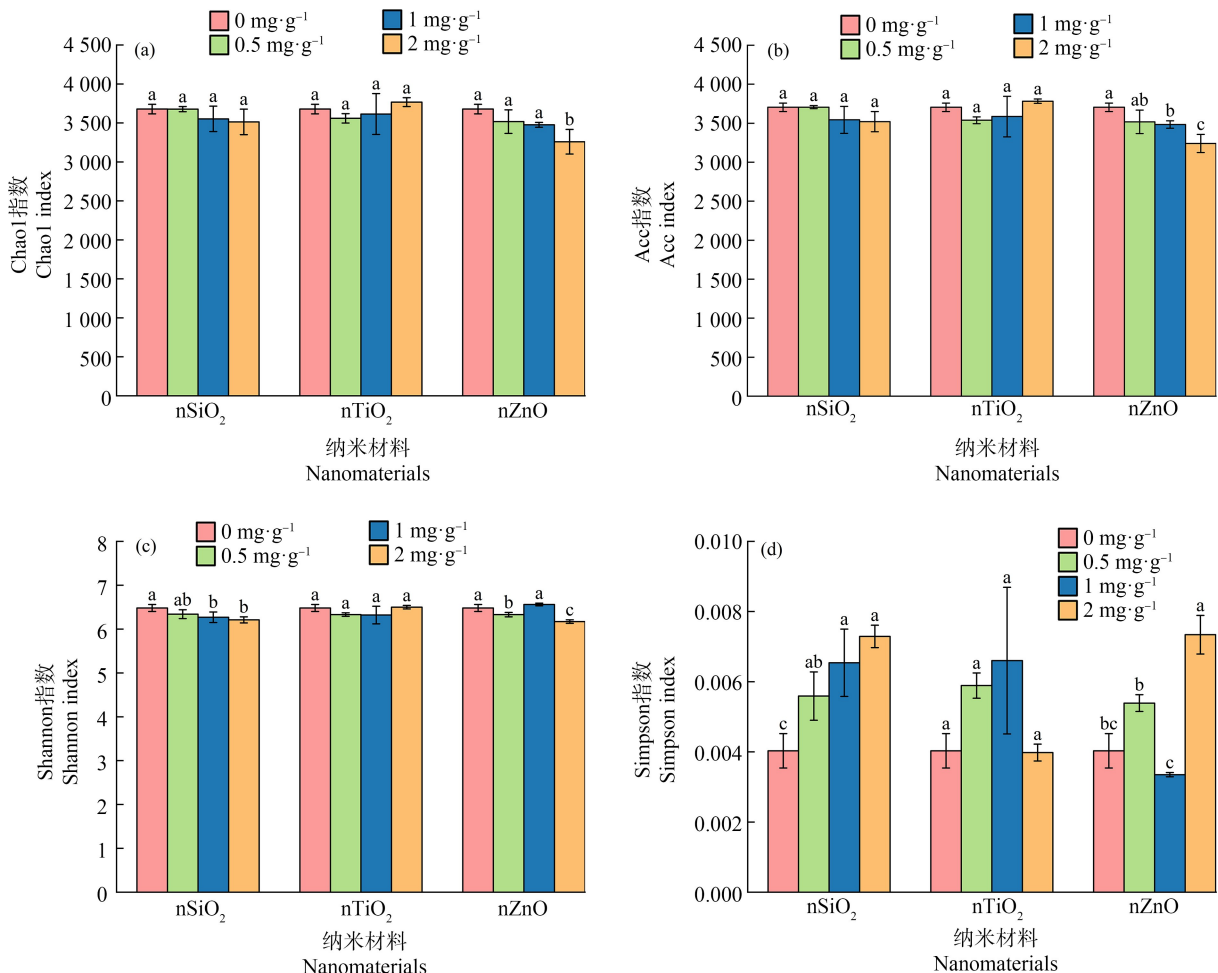


图 4 3 种纳米材料对土壤细菌群落 α 多样性的影响

Fig. 4 Effects of three nanomaterials on the α -diversity of soil bacterial communities

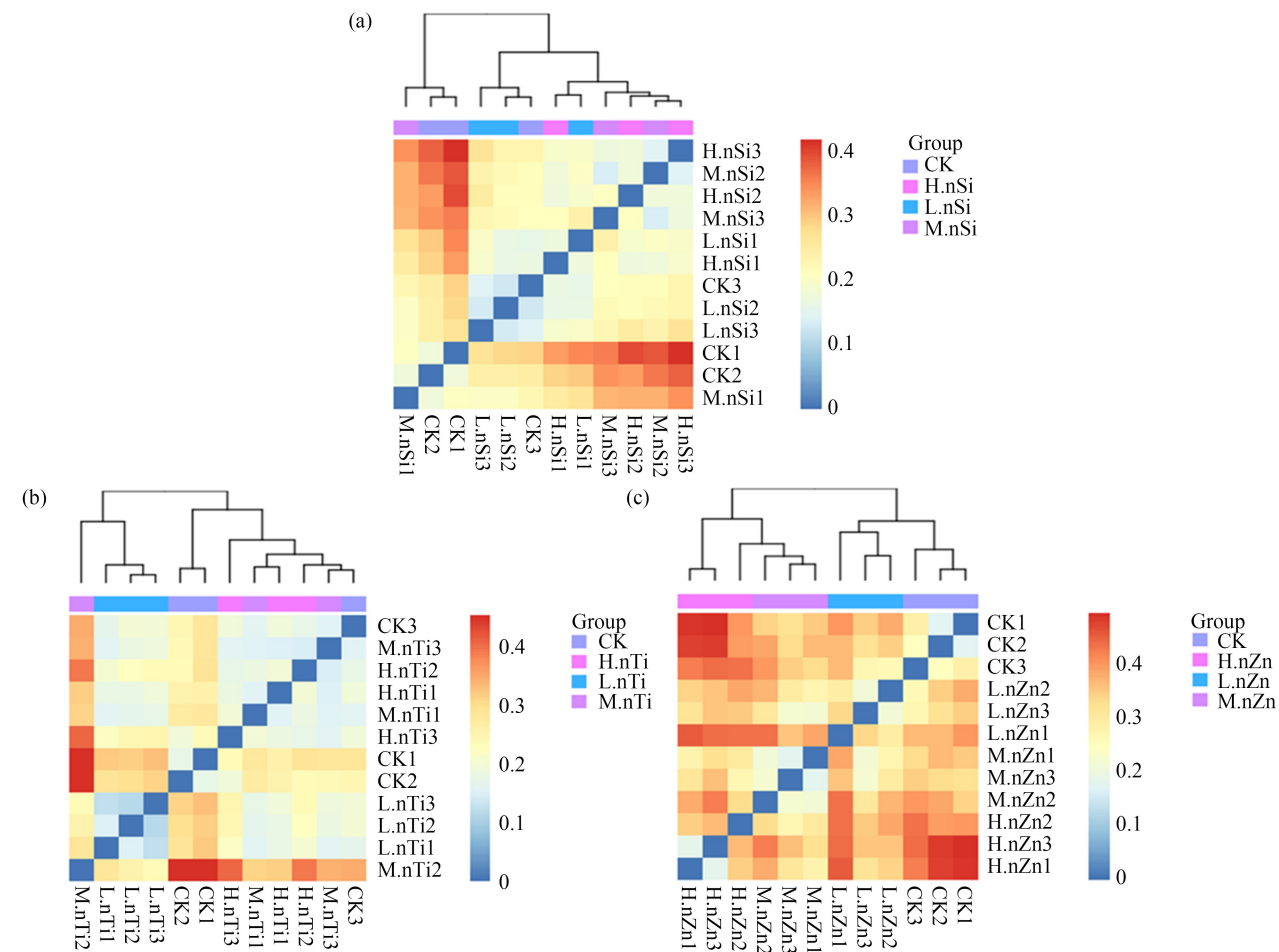


图 5 基于 Bray Curtis 分析的纳米材料对根际土壤细菌群落 β 多样性的影响

注:(a) nSi 为 nSiO_2 , (b) nTi 为 nTiO_2 , (c) nZn 为 nZnO ; L 为 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, M 为 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, H 为 $2.00 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

Fig. 5 Effects of nanomaterials on β -diversity of rhizosphere soil bacterial community based on Bray Curtis analysis

Note: (a) nSi stands for nSiO_2 ; (b) nTi stands for nTiO_2 ; (c) nZn stands for nZnO ; L stands for $0.50 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$;

M stands for $1.00 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; H stands for $2.00 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$.

如图 6(a) 所示, PC1 轴和 PC2 轴贡献率分别为 28.42% 和 24.62%, 累计贡献率为 53.04%, 是构成差异的主要来源。不同处理的细菌群落表现出明显分布模式, PC1 对 nZnO 和其他处理(CK 处理、 nSiO_2 和 nTiO_2 处理)进行了区分, 来自 CK 处理、 nSiO_2 处理、 nTiO_2 处理的细菌群落显示出更近相对距离。相反, CK 处理和 nZnO 处理的细菌群落相对距离较远, 表现出显著的差异($r=0.4599$, $P<0.01$)。水稻幼苗生理性质与相对丰度最高的 27 个关键菌属 Pearson 相关分析表明(图 6(b)), *Catellatospora* 等属与水稻幼苗 CAT 活性显著正相关($P<0.05$), *Candidatus_Koribacter* 等属与 CAT 活性显著负相关($P<0.05$); *Candidatus_Solibacter* 属与水稻幼苗 SP 含量显著正相关($P<0.01$), *Nitrososvibrio* 属与 SP 含量显著负相

关($P<0.01$); *Sphingomonas* 属与水稻幼苗 SOD 活性显著正相关($P<0.05$), *Clostridium* 属与 SOD 活性显著负相关($P<0.01$); *Catellatospora* 属与水稻幼苗 POD 活性显著正相关($P<0.05$)。 *Alicyclobacillus* 和 *Bacillus* 等属与水稻幼苗株高(PH)、鲜质量(FW)、干质量(DW)呈显著正相关($P<0.05$), *Bradyrhizobium* 属与水稻株高(PH)显著负相关($P<0.05$)。

2.2.3 水稻根际土壤细菌的功能注释空间

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 数据库将一级代谢通路分为 6 个大类: 细胞过程(cellular processes)、环境信息处理(environmental information processing)、遗传信息处理(genetic information processing)、人类疾病(human diseases)、新陈代谢(metabolism)及生物体系统(organismal systems)。

基于 KEGG 数据库对不同纳米材料处理的根际土壤细菌二级基因功能进行注释分析如表 3 所示。结果显示,所有处理的根际土壤样品中含一级生物代谢通路的 6 个大类,新陈代谢功能基因相对个数在各处理根际土壤中占比最大,平均值为 51.42%。各样品细菌代谢通路注释分析得出,与二级代谢通路相关的共有 24 类,其中各类功能基因相对丰度 > 1% 有 23 类。3 种纳米材料暴露后,氨基酸代谢功能基因的相对丰度均高于 CK 处理。在 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ nSiO₂ 处理及 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $2.00 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ nTiO₂ 处理后,脂质代谢功能基因相对丰度显著升高,且 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $2.00 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ nTiO₂ 处理增加了其他氨基酸代谢、异生素生物降解和代谢功能基因的相对丰度,但遗传信息处理和能量代谢功能基因的相对丰度显著下降。与 CK 处理比, $1.00 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $2.00 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ nZnO 处理的聚糖生物合成和代谢、细胞过程和信号和表征不佳功能基因的相对丰度均降低,且 $2.00 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ nZnO 处理还显著降低细胞运动、信号转导、转录和翻译等功能基因的相对丰度。

3 讨论 (Discussion)

植物在正常生长条件下,体内存在一套可维持体内活性氧(reactive oxygen species, ROS)动态平衡的保护机制。纳米材料暴露对植物造成胁迫产生大量 ROS,ROS 动态平衡被打破,导致 ROS 过度累积,可引起细胞膜脂过氧化反应,进而破坏生物膜结构与正常代谢过程,使植物细胞受到伤害甚至死亡^[24]。本研究中,经 3 种纳米材料处理后,水稻幼苗显示出不同酶分子如 POD、CAT 等抗氧化酶活性均升高,其抗氧化产物显著增加,这可能是 ROS 过度积累激活水稻的自我保护机制^[25]。Iannone 等^[26]在研究中发现, nFe₃O₄ 处理后小麦中的抗氧化酶(POD、SOD 和 CAT)活性增加。Kim 等^[27]发现黄瓜在 nZnO 处理后三大抗氧化酶活性均升高;Li 等^[28]在 nTiO₂ 对油菜的影响研究中也得到类似的结果。为清除 ROS,植物细胞利用上述 3 种抗氧化酶将 ROS 转化成 H₂O 和 O₂^[29],并维持正常生理活动,提高植物对环境的适应能力^[30]。本研究发现, nSiO₂ 和 nTiO₂ 处理均提高水稻幼苗 SOD 活性,但用 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ nZnO 处理后则 SOD 活性受

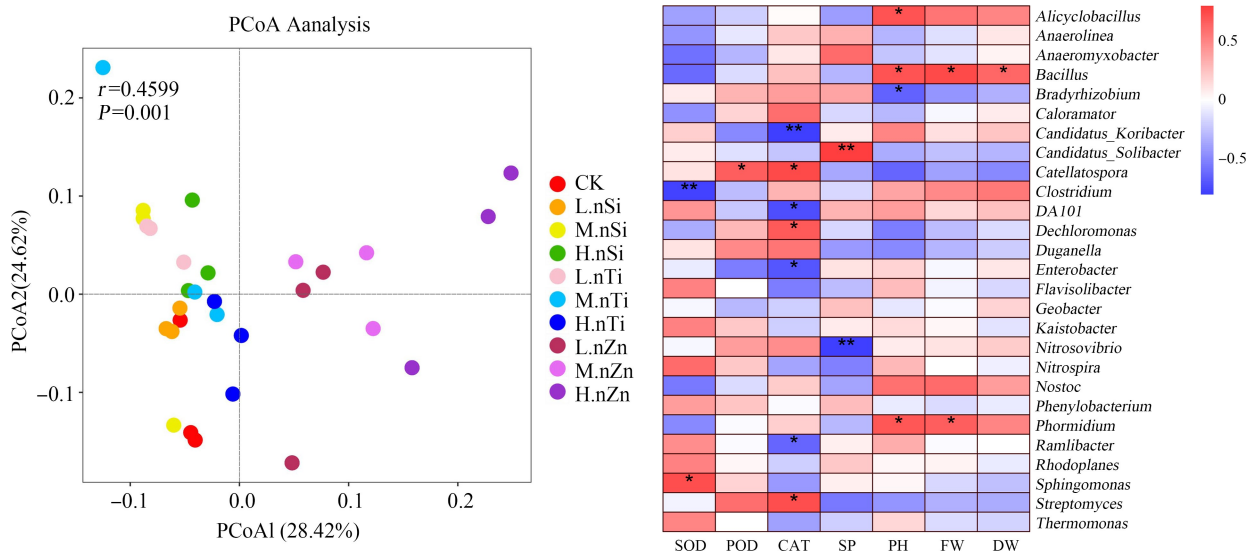


图 6 3 种纳米材料处理后水稻根际土壤细菌群落 PCoA 分析 (a) 及水稻生理指标与关键菌属丰度相关性分析 (b)

注:(a) 同颜色为每个处理的 3 个重复;L 为 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, M 为 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, H 为 $2.00 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; nSi 为 nSiO₂, nTi 为 nTiO₂, nZn 为 nZnO;

(b) * 表示 $P<0.05$, ** 表示 $P<0.01$; SOD 表示超氧化物歧化酶; POD 表示过氧化物酶; CAT 表示过氧化氢酶;

SP 表示可溶性蛋白; PH 表示株高; FW 表示鲜质量; DW 表示干质量。

Fig. 6 PCoA analysis of bacterial community in rhizosphere soil of rice after treatment of three nanomaterials (a) and correlation analysis of physiological indexes of rice with abundance of key bacteria genera (b)

Note: (a) Three replicates of the same color for each treatment; L stands for $0.50 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; M stands for $1.00 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; H stands for $2.00 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; nSi stands for nSiO₂; nTi stands for nTiO₂; nZn stands for nZnO; (b) * represents $P<0.05$; ** represents $P<0.01$; SOD means superoxide dismutase; POD means peroxidase; CAT means catalase; SP means soluble protein; PH means plant height; FW means fresh weight; DW means dry weight.

表 3 水稻根际土壤细菌的功能基因丰度注释

Table 3 Functional gene abundance annotation of rice rhizosphere soil bacteria

代谢功能 Metabolic function	CK	L.nSi	M.nSi	H.nSi	L.nTi	M.nTi	H.nTi	L.nZn	M.nZn	H.nZn
氨基酸代谢 Amino acid metabolism	10.53b	10.61ab	10.67a	10.68a	10.71a	10.70a	10.61ab	10.59b	10.69a	10.69a
其他次生代谢物的生物合成 Biosynthesis of other secondary metabolites	1.26a	1.26a	1.26a	1.26a	1.24a	1.23a	1.27a	1.23ab	1.23ab	1.21b
碳水化合物代谢 Carbohydrate metabolism	10.67a	10.64a	10.65a	10.67a	10.63a	10.58a	10.73a	10.59a	10.61a	10.68a
细胞运动 Cell motility	3.20a	3.22a	3.16a	3.10a	3.16a	3.17a	3.12a	3.08ab	3.14ab	3.06b
细胞过程和信号 Cellular processes and signaling	3.59a	3.62a	3.60a	3.61a	3.58a	3.56a	3.55a	3.57a	3.45b	3.43b
能量代谢 Energy metabolism	6.04a	6.00a	5.98a	6.00a	5.96b	5.94b	6.03a	6.10a	6.01a	6.08a
酶家族 Enzyme families	2.25a	2.24a	2.23a	2.23a	2.21a	2.21a	2.24a	2.26a	2.25a	2.20b
折叠、分类和降解 Folding, sorting and degradation	2.39a	2.39a	2.37a	2.38a	2.36a	2.36a	2.37a	2.38a	2.35b	2.40a
遗传信息处理 Genetic information processing	2.55b	2.52bc	2.51c	2.52bc	2.50c	2.51c	2.54bc	2.59a	2.54ab	2.57ab
聚糖生物合成和代谢 Glycan biosynthesis and metabolism	2.58a	2.53a	2.48a	2.49a	2.42a	2.40a	2.50a	2.40a	2.33b	2.35b
脂质代谢 Lipid metabolism	3.88b	3.95ab	3.96a	3.95ab	3.98a	3.97a	3.92ab	3.88b	3.91b	3.85b
膜运输 Membrane transport	9.93a	9.53a	9.61a	9.47a	9.68a	9.83a	9.88a	9.95a	10.34a	10.28a
代谢 Metabolism	2.57a	2.55a	2.55a	2.54a	2.55a	2.55a	2.55a	2.55ab	2.54ab	2.50b
辅因子和维生素的代谢 Metabolism of cofactors and vitamins	4.15a	4.16a	4.16a	4.18a	4.16a	4.16a	4.14a	4.20a	4.15a	4.20a
萜类化合物和聚酮化合物的代谢 Metabolism of terpenoids and polyketides	2.04a	2.07a	2.08a	2.10a	2.11a	2.11a	2.06a	2.08a	2.10a	2.09a
其他氨基酸的代谢 Metabolism of other amino acids	1.78b	1.82b	1.83b	1.83b	1.85a	1.84a	1.79ab	1.80b	1.81b	1.80b
核苷酸代谢 Nucleotide metabolism	3.24b	3.25b	3.23b	3.26b	3.22b	3.22b	3.24b	3.25ab	3.22b	3.27ab
表征不佳 Poorly characterized	5.28a	5.43a	5.28a	5.29a	5.26ab	5.24bc	5.28a	5.26ab	5.21bc	5.17c
复制和修复 Replication and repair	7.14ab	7.20a	7.18a	7.23a	7.14ab	7.13ab	7.15ab	7.18a	7.05b	7.16a
信号转导 Signal transduction	2.22a	2.22a	2.20ab	2.17b	2.21ab	2.22a	2.18ab	2.18b	2.19ab	2.13c
转录 Transcription	2.58a	2.57a	2.55a	2.55a	2.54ab	2.54ab	2.56a	2.53ab	2.55ab	2.49b
翻译 Translation	4.47b	4.46b	4.45b	4.46b	4.42b	4.43b	4.46b	4.49b	4.46b	4.58a
异生素生物降解和代谢 Xenobiotics biodegradation and metabolism	2.89b	3.01ab	3.09ab	3.11ab	3.20a	3.20a	2.96ab	3.01ab	3.08ab	3.00ab

注:功能基因相对丰度单位为%;L 为 0.50 mg·g⁻¹,M 为 1.00 mg·g⁻¹,H 为 2.00 mg·g⁻¹;nSi 为 nSiO₂,nTi 为 nTiO₂,nZn 为 nZnO。

Note: The unit of relative abundance of functional genes is %; L stands for 0.50 mg·g⁻¹, M stands for 1.00 mg·g⁻¹, H stands for 2.00 mg·g⁻¹; nSi stands for nSiO₂; nTi stands for nTiO₂; nZn stands for nZnO.

抑制。此外, nSiO_2 处理对 SP 的含量影响很小, 而高浓度 nTiO_2 处理可降低 SP 含量, 中、高浓度 ($1.00 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $2.00 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) nZnO 处理可提高 SP 含量。SP 作为植物体内重要的渗透调节物质, 水稻幼苗通过增强渗透调节作用来抵抗纳米材料造成胁迫的影响。 nSiO_2 处理及 nZnO 处理均可显著降低水稻幼苗的株高、鲜质量和干质量, 而 nTiO_2 处理对水稻幼苗鲜质量和干质量没有显著性影响。原因可能是纳米材料种类不同, 对水稻幼苗产生不同的生理障碍。研究表明, 纳米材料在植物中的毒性, 取决于 NPs 暴露时间、植物种类以及 NPs 的类型、大小和来源^[31]。纳米材料进入水稻植株的方式主要取决于其尺寸, 直径小的纳米材料可通过细胞壁、细胞膜和核膜的孔及离子通道等, 还可通过水稻细胞的主动运输或吞噬作用进入体内, 以此来影响水稻的生命活动。直径较大的纳米材料不易进入水稻细胞, 但也会阻碍水稻的生长发育并产生毒害^[32]。此外, Joško 等^[33]研究发现, nZnO 的毒性主要来源于锌离子, 而在土壤中 nTiO_2 和 nSiO_2 较难释放相应的金属离子^[34-35]。王壮等^[36]进一步研究发现, nZnO 对淡水绿藻的生长抑制毒性均明显高于 nTiO_2 , 溶解释放的 Zn^{2+} 在 nZnO 对斜生栅藻毒性效应中的贡献高于 nZnO 对蛋白核小球藻毒性效应中的贡献; nZnO 的毒性在 nZnO 与 nTiO_2 二元混合物毒性中占主要贡献, nZnO 和 nTiO_2 对淡水绿藻的联合毒性机制与纳米颗粒诱导活性氧物种生成, 引起藻细胞氧化应激有关。本研究中, 3 种纳米材料的尺度相同, 但构成元素不同, 相应的其水力直径也不同, nZnO 的水力直径最小, nTiO_2 的水力直径最大, 因而, nZnO 表现出的毒性作用强于 nSiO_2 , 而 nTiO_2 的毒性最弱。 nZnO 表现出较强的毒性效应, 可归因于 nZnO 颗粒不仅可吸附在细胞表面, 且还可进入细胞内部, 而影响物质转运和吸收^[37]。此外, nZnO 在环境和生物介质中部分溶解释放出 Zn^{2+} ^[38-39], 使细胞产生 ROS 形成氧化胁迫, 诱导 DNA 损伤, 对生物细胞产生毒性^[40]。综上所述, 3 种纳米材料对水稻的毒性机制与纳米颗粒诱导 ROS 形成引起水稻细胞的氧化应激相关, 研究结果与王壮等^[36]得到的结论类似。

通过 16S rDNA 高通量测序分析 3 种纳米材料暴露对水稻根际土壤细菌健康的影响。本研究发现, nZnO 处理可改变细菌群落组成, 显著降低水稻根际土壤细菌丰度及多样性。随着纳米材料浓度越高, 对水稻根际土壤细菌群落结构及 α 多样性的负

面影响越大。纳米材料对根际土壤细菌群落的毒性已得到充分证明, 其暴露对细菌群落结构及多样性有显著影响。You 等^[41]在研究 nZnO 对盐碱地和黑土土壤酶活性和细菌群落的影响时也得到类似的结果, 并发现土壤细菌群落受到影响, 抑制生物固氮; Chai 等^[42]还通过热代谢、功能菌丰度和酶活性评价 nZnO 和 nCeO_2 的毒性, 发现其抑制细菌产热代谢, 减少农业土壤中固氮菌、磷溶菌和钾溶菌的数量, 抑制土壤酶的活性。在本研究中, $0.50 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ nSiO_2 处理使得水稻根际土壤细菌物种的丰度增加, $2.00 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ nSiO_2 处理导致其细菌多样性显著降低, 群落结构变化明显。Zhang 等^[43]研究发现, 低浓度 nSiO_2 对厌氧氨氧化菌群落结构影响较小, 但 $200.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ nSiO_2 处理使厌氧氨氧化菌多样性降低, 这与本研究结果相类似。另外, 微生物群落差异分析表明, 3 种纳米材料中 nZnO 对土壤细菌群落结构影响最大, 其次是 nSiO_2 , 而 nTiO_2 并未表现出较显著差异, 且在研究中发现 $2.00 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ nTiO_2 处理未显著改变水稻根际土壤细菌群落组成及多样性, 这一结果被许多学者证实, nTiO_2 与其他金属氧化物纳米材料的负面影响明显不同^[18,44]。可见, 纳米材料诱导的毒性也与纳米材料类型有关。究其原因, nTiO_2 的水力直径最大, 有可能聚集并倾向于形成相对较大的团块, 通过减少 NPs 与土壤中微生物细胞之间潜在的直接相互作用来降低其纳米相关毒性^[45]。

此外, Pearson 相关性分析表明, 根际土壤细菌群落结构差异影响了水稻幼苗的抗氧化酶活性和生物量。其中 *Catellatospora* 和 *Sphingomonas* 等属的相对丰度与水稻幼苗抗氧化酶活性和生物量呈显著正相关 ($P < 0.05$), 而 *Candidatus_Koribacter*、*Nitrososvibrio* 和 *Clostridium* 等属的相对丰度与其呈显著负相关 ($P < 0.05$)。Zhou 等^[46]研究指出, 钼纳米材料会影响大豆根部的微生物群落, 进而影响大豆植株的生长和发育。由此可见, 纳米材料可直接对水稻幼苗产生生理毒性, 还可改变根际土壤细菌群落结构, 间接造成水稻幼苗氧化应激和渗透胁迫, 进而影响幼苗生长和发育。

从不同处理土壤细菌群落结构比较来看, 3 种纳米材料处理的根际土壤中, 芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、*Flavisolibacter* 属、*Kaistobacter* 属、红游动菌属 (*Rhodoplanes*) 和 *Candidatus Solibacter* 菌属的相对丰度均显著提升。前人的研究指出, 这些细菌属的主要作用为植物促生、脱氮功能细菌, 其中黄色土源菌属和

芽孢杆菌属为重要的根际促生菌属^[47],可促进根系发育、增加叶面积,具有抑制土传病害和促进植物生长的功能^[48]; *Rhodoplanes*、*Kaistobacter* 属和 *Flavisolibacter* 属对高硝酸盐、重金属具有耐受性的反硝化菌属; *Candidatus Solibacter* 为能分解有机质、利用碳源的植物促生功能菌^[49]。此外,有研究表明,纳米硒的生物强化可以促进根际土壤中的 *Gammaproteobacteria*、*Bacteroidia*、*Gemmatimonadetes*、*Deltaproteobacteria* 和 *Anaerolineae* 等有益微生物。微生物群落的变化与环境指数、酶、土壤代谢物、硒形态密切相关,纳米硒的应用降低了辣椒植株中镉的生物有效性和积累,通过改善土壤质量和分配根际土壤及辣椒植株中的信号分子水平来整合土壤-植物平衡^[50]。可见,纳米材料的运用使得植物-微生物关系更为密切。水稻幼苗受到因3种纳米材料造成的氧化应激,根际细菌群落迅速反应,根际土壤促生和反硝化功能优势细菌的丰度提高,其多样性增加,并改变根际土壤细菌群落结构,而提高植物对纳米材料的抗性,对纳米材料污染土壤的生态修复奠定基础。

本研究结果表明,细菌群落主要涉及到4类一级基因功能,包含细胞过程、环境信息处理、遗传信息处理及新陈代谢,且新陈代谢功能基因相对丰度在各处理土壤中占比最大,这与大多相关研究结果相似^[51],3种纳米材料未改变水稻根际土壤细菌群落的一级功能类型。受3种纳米材料影响的根际土壤细菌二级基因功能主要涉及23类,其中相对丰度排名前五为氨基酸代谢、碳水化合物代谢、膜运输、复制和修复和能量代谢。氨基酸代谢将蛋白质转为铵态氮,这主要与氮元素循环相关^[52]。Guo等^[53]的研究表明,氨基酸代谢产物能通过微环境调控微生物群落结构和相对丰度变化并影响碳氮损失。3种纳米材料能显著提高根际土壤细菌的氨基酸代谢功能,进而影响水稻根际微生态,调控根际土壤细菌群落结构和提高反硝化细菌的丰度。脂质是构成生物膜的主要成分,调节细胞生长、分化、衰老、程序性死亡等信号传导过程。在 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ nSiO_2 以及 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ nTiO_2 处理后脂质代谢显著增强。在 nTiO_2 暴露的铜绿假单胞菌中观察到氧化应激反应,诱导细菌 ROS 产生,细菌外膜的损伤刺激细胞质膜中脂肪酸的产生,脂质代谢增强^[54-55],这也与本研究结果类似。根际土壤细菌的4类一级功能包括细胞过程、环境信息处理、遗传信息处理及新陈代谢均受到 nZnO 显著影响, nZnO 降低聚糖生物

合成和代谢、细胞过程和信号、细胞运动、信号转导、转录和翻译等基因功能,原因可能是 nZnO 可吸附在细胞表面破坏细胞结构,影响细胞信号转导,且 nZnO 还可进入细胞内部影响细胞内物质转运和吸收^[37],造成细胞内遗传物质的转录和翻译功能降低。

综上所述,3种尺度相同的纳米材料可直接对水稻幼苗产生生理毒性,但因 nZnO 和 nTiO_2 的水力直径分别为最小和最大而相应表现出最强和最弱的毒性效应。此外,3种纳米材料尤其是 nSiO_2 和 nZnO 还可通过改变根际土壤细菌基因功能,降低水稻根际土壤细菌多样性并改变群落组成及结构,间接造成水稻幼苗氧化应激和渗透胁迫,进而不同程度地影响幼苗生长和发育,其中 nZnO 的抑制效果最显著。3种纳米材料对水稻幼苗生理和根际细菌群落表现出的毒性大小顺序: $\text{nZnO} > \text{nSiO}_2 > \text{nTiO}_2$ 。本研究利用盆栽试验,通过高通量测序等方法初步分析3种纳米材料对水稻幼苗生理及根际土壤细菌群落的影响,但高通量测序本身存在一定的局限性,进一步研究将结合宏基因组测序、转录组测序等生物信息学分析方法深入研究3种纳米材料对水稻幼苗及根际土壤细菌群落的潜在危害。

通信作者简介:刘灵(1968—),女,博士,副教授,主要研究方向为植物生理生态学、植物营养学。

参考文献 (References):

- [1] Brayner R, Ferrari-Iliou R, Brivois N, et al. Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultra-fine ZnO nanoparticles colloidal medium [J]. Nano Letters, 2006, 6(4): 866-870
- [2] Gottschalk F, Sonderer T, Scholz R W, et al. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO_2 , ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions [J]. Environmental Science & Technology, 2009, 43(24): 9216-9222
- [3] Mukherjee A, Peralta-Videa J R, Bandyopadhyay S, et al. Physiological effects of nanoparticulate ZnO in green peas (*Pisum sativum* L.) cultivated in soil [J]. Metallomics: Integrated Biometal Science, 2014, 6(1): 132-138
- [4] Yang Z Z, Chen J, Dou R Z, et al. Assessment of the phytotoxicity of metal oxide nanoparticles on two crop plants, maize (*Zea mays* L.) and rice (*Oryza sativa* L.) [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2015, 12(12): 15100-15109
- [5] Yoon S J, Kwak J I, Lee W M, et al. Zinc oxide nanopar-

- ticles delay soybean development: A standard soil microcosm study [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2014, 100: 131-137
- [6] Vannini C, Domingo G, Onelli E, et al. Phytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles exposure on germinating wheat seedlings [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2014, 171(13): 1142-1148
- [7] Servin A D, Morales M I, Castillo-Michel H, et al. Synchrotron verification of TiO_2 accumulation in cucumber fruit: A possible pathway of TiO_2 nanoparticle transfer from soil into the food chain [J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(20): 11592-11598
- [8] Shaw A K, Ghosh S, Kalaji H M, et al. Nano-CuO stress induced modulation of antioxidative defense and photosynthetic performance of Syrian barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2014, 102: 37-47
- [9] Ge Y, Priester J H, van De Werfhorst L C, et al. Potential mechanisms and environmental controls of TiO_2 nanoparticle effects on soil bacterial communities [J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(24): 14411-14417
- [10] Priester J H, Ge Y, Chang V, et al. Assessing interactions of hydrophilic nanoscale TiO_2 with soil water [J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 2013, 15(9): 1899
- [11] Ge Y, Schimel J P, Holden P A. Identification of soil bacteria susceptible to TiO_2 and ZnO nanoparticles [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78 (18): 6749-6758
- [12] Frenk S, Ben-Moshe T, Dror I, et al. Effect of metal oxide nanoparticles on microbial community structure and function in two different soil types [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (12): e84441
- [13] 徐辰. 氧化铜纳米颗粒对稻田土壤及微生物生态的作用机制[D]. 杭州: 浙江大学, 2016: 104-111
- Xu C. Effect of copper oxide nanoparticles on properties and microbial ecosystem of paddy soil [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016: 104-111 (in Chinese)
- [14] 伍玲丽, 杨玉蓉, 张丽, 等. 纳米银对土壤固氮微生物群落结构及固氮活性的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2019, 38(12): 2757-2763
- Wu L L, Yang Y R, Zhang L, et al. Effects of silver nanoparticle (AgNP) on soil nitrogen-fixing microbial community structure and nitrogenase activity [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2019, 38 (12): 2757-2763 (in Chinese)
- [15] McGee C F, Storey S, Clipson N, et al. Soil microbial community responses to contamination with silver, aluminium oxide and silicon dioxide nanoparticles [J]. *Ecotoxicology*, 2017, 26(3): 449-458
- [16] Zhang L L, Jiang Y H, Ding Y L, et al. Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids) [J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 2007, 9(3): 479-489
- [17] 徐江兵, 王艳玲, 罗小三, 等. 纳米氧化锌对堆肥过程中细菌群落演替的影响[J]. *应用与环境生物学报*, 2017, 23(6): 1166-1171
- Xu J B, Wang Y L, Luo X S, et al. Influence of zinc oxide nanoparticles on the succession of bacterial communities during the composting process [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2017, 23 (6): 1166-1171 (in Chinese)
- [18] 周庆. 金属氧化物纳米材料对土壤微生物群落及甲霜灵转化的影响[D]. 武汉: 武汉大学, 2020: 69-70
- Zhou Q. Effects of metal oxide nanoparticles on soil microbial community and transformation of racemic-metal-axyl [D]. Wuhan: Wuhan University, 2020: 69-70 (in Chinese)
- [19] 李可心, 吴英海, 宛立, 等. 纳米二氧化钛驱动的人工湿地基质微生物群落差异[J]. *生态学杂志*, 2020, 39 (12): 4068-4077
- Li K X, Wu Y H, Wan L, et al. Variation of microbial community in constructed wetland substrate motivated by nano titanium dioxide [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2020, 39(12): 4068-4077 (in Chinese)
- [20] Hao Y, Xu B L, Ma C X, et al. Synthesis of novel mesoporous carbon nanoparticles and their phytotoxicity to rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Journal of Saudi Chemical Society*, 2019, 23(1): 75-82
- [21] 尹勇, 刘灵. 三种纳米材料对水稻幼苗生长及根际土壤肥力的影响[J]. *农业资源与环境学报*, 2020, 37(5): 736-743
- Yin Y, Liu L. Effects of three nanomaterials on the growth and rhizospheric soil fertility of rice seedlings [J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2020, 37(5): 736-743 (in Chinese)
- [22] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 164-175
- [23] 蒋治岩, 邹青勤, 杨柳, 等. 典型黑土区不同菌根类型树种根系分泌速率及根际效应差异[J]. *生态学杂志*, 2021, 40(9): 2709-2718
- Jiang Z Y, Zou Q Q, Yang L, et al. Root exudation rate and rhizosphere effect of different mycorrhizal associations of tree species in typical black soil area [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2021, 40(9): 2709-2718 (in Chinese)
- [24] 赵婷, 李琴, 潘学军, 等. 陆生植物对淹水胁迫的适应机制[J]. *植物生理学报*, 2021, 57(11): 2091-2103

- Zhao T, Li Q, Pan X J, et al. Adaptive mechanism of terrestrial plants to waterlogging stress [J]. *Plant Physiology Journal*, 2021, 57(11): 2091-2103 (in Chinese)
- [25] Song G L, Hou W H, Gao Y, et al. Effects of CuO nanoparticles on *Lemna minor* [J]. *Botanical Studies*, 2016, 57(1): 3
- [26] Iannone M F, Groppa M D, de Sousa M E, et al. Impact of magnetite iron oxide nanoparticles on wheat (*Triticum aestivum* L.) development: Evaluation of oxidative damage [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2016, 131: 77-88
- [27] Kim S, Lee S, Lee I. Alteration of phytotoxicity and oxidant stress potential by metal oxide nanoparticles in *Cucumis sativus* [J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2012, 223(5): 2799-2806
- [28] Li J, Naeem M S, Wang X P, et al. Nano-TiO₂ is not phytotoxic As revealed by the oilseed rape growth and photosynthetic apparatus ultra-structural response [J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0143885
- [29] Dvořák P, Krasylenko Y, Zeiner A, et al. Signaling toward reactive oxygen species-scavenging enzymes in plants [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 618835
- [30] Sytar O, Kumar A, Latowski D, et al. Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2013, 35(4): 985-999
- [31] Sheykhabglou R, Sedghi M, Shishevan M T, et al. Effects of nano-iron oxide particles on agronomic traits of soybean [J]. *Notulae Scientia Biologicae*, 2010, 2(2): 112-113
- [32] 桂新. 几种纳米氧化物的生物效应与机制[D]. 北京: 中国农业大学, 2016: 52-54
- Gui X. Bio-effects and mechanisms of several nano-oxide materials [D]. Beijing: China Agricultural University, 2016: 52-54 (in Chinese)
- [33] Joško I, Oleszczuk P, Futa B. The effect of inorganic nanoparticles (ZnO, Cr₂O₃, CuO and Ni) and their bulk counterparts on enzyme activities in different soils [J]. *Geoderma*, 2014, 232-234: 528-537
- [34] 柴汉魁. 四种金属氧化物纳米颗粒对农业土壤微生物的毒性研究[D]. 北京: 北京科技大学, 2017: 85-87
- Chai H K. The toxic effect study of four metal oxide nanoparticles on agricultural soil microorganism [D]. Beijing: University of Science and Technology Beijing, 2017: 85-87 (in Chinese)
- [35] Du W C, Sun Y Y, Ji R, et al. TiO₂ and ZnO nanoparticles negatively affect wheat growth and soil enzyme activities in agricultural soil [J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 2011, 13(4): 822-828
- [36] 王壮, 金世光, 张帆, 等. 氧化锌和二氧化钛纳米颗粒对淡水绿藻的单一及联合毒性研究[J]. *农业环境科学学报*, 2021, 40(10): 2095-2105
- Wang Z, Jin S G, Zhang F, et al. Single and joint toxicity of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles for freshwater algae [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2021, 40(10): 2095-2105 (in Chinese)
- [37] 刘倩, 杜青平, 刘涛, 等. 纳米氧化锌致大型溞的毒性效应特征[J]. *环境科学学报*, 2019, 39(4): 1332-1339
- Liu Q, Du Q P, Liu T, et al. Study on the toxicity effects of nanometer zinc oxide on *Daphnia magna* [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2019, 39(4): 1332-1339 (in Chinese)
- [38] Franklin N M, Rogers N J, Apte S C, et al. Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The importance of particle solubility [J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(24): 8484-8490
- [39] 尹勇. 三种金属氧化物纳米材料对水稻幼苗生长及根际微生物群落结构的影响[D]. 桂林: 广西师范大学, 2019: 43-44
- Yin Y. Effects of three metal oxide nanomaterials on growth and rhizospheric microbial community structure of rice seedling [D]. Guilin: Guangxi Normal University, 2019: 43-44 (in Chinese)
- [40] Dinesh R, Anandaraj M, Srinivasan V, et al. Engineered nanoparticles in the soil and their potential implications to microbial activity [J]. *Geoderma*, 2012, 173-174: 19-27
- [41] You T T, Liu D D, Chen J, et al. Effects of metal oxide nanoparticles on soil enzyme activities and bacterial communities in two different soil types [J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2018, 18(1): 211-221
- [42] Chai H K, Yao J, Sun J J, et al. The effect of metal oxide nanoparticles on functional bacteria and metabolic profiles in agricultural soil [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2015, 94(4): 490-495
- [43] Zhang Z Z, Cheng Y F, Xu L Z, et al. Evaluating the effects of metal oxide nanoparticles (TiO₂, Al₂O₃, SiO₂ and CeO₂) on anammox process: Performance, microflora and sludge properties [J]. *Bioresource Technology*, 2018, 266: 11-18
- [44] Xu C, Peng C, Sun L J, et al. Distinctive effects of TiO₂ and CuO nanoparticles on soil microbes and their community structures in flooded paddy soil [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 86: 24-33
- [45] 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
- [46] Zhou Y, Ma J, Yang J H, et al. Soybean rhizosphere microorganisms alleviate Mo nanomaterials induced stress by improving soil microbial community structure [J]. Chemosphere, 2023, 310: 136784
- [47] Ahmad F, Ahmad I, Khan M S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities [J]. Microbiological Research, 2008, 163 (2): 173-181
- [48] Gravel V, Antoun H, Tweddell R J. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA) [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2007, 39(8): 1968-1977
- [49] Rime T, Hartmann M, Brunner I, et al. Vertical distribution of the soil microbiota along a successional gradient in a glacier forefield [J]. Molecular Ecology, 2015, 24(5): 1091-1108
- [50] Li D, Zhou C R, Wu Y L, et al. Nanoselenium integrates soil-pepper plant homeostasis by recruiting rhizosphere-beneficial microbiomes and allocating signaling molecule levels under Cd stress [J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 432: 128763
- [51] 薛玉琴, 徐飞, 刘坤和, 等. 面源污染诱导嘉陵江沉积物中细菌群落结构与功能异变[J]. 环境科学, 2022, 43 (5): 2595-2605
- Xue Y Q, Xu F, Liu K H, et al. Non-point source pollution (NPSP) induces structural and functional variation in bacterial communities in sediments of Jialing River [J]. Environmental Science, 2022, 43(5): 2595-2605 (in Chinese)
- [52] 闫冰, 付嘉琦, 夏嵩, 等. 厌氧氨氧化启动过程细菌群落多样性及 PICRUSt2 功能预测分析[J]. 环境科学, 2021, 42(8): 3875-3885
- Yan B, Fu J Q, Xia S, et al. Diversity and PICRUSt2-based predicted functional analysis of bacterial communities during the start-up of ANAMMOX [J]. Environmental Science, 2021, 42(8): 3875-3885 (in Chinese)
- [53] Guo X C, Liu S, Wang Z, et al. Metagenomic profiles and antibiotic resistance genes in gut microbiota of mice exposed to arsenic and iron [J]. Chemosphere, 2014, 112: 1-8
- [54] Kubacka A, Diez M S, Rojo D, et al. Understanding the antimicrobial mechanism of TiO₂-based nanocomposite films in a pathogenic bacterium [J]. Scientific Reports, 2014, 4: 4134
- [55] Echavarri-Bravo V, Paterson L, Aspray T J, et al. Shifts in the metabolic function of a benthic estuarine microbial community following a single pulse exposure to silver nanoparticles [J]. Environmental Pollution, 2015, 201: 91-99 ◆