



文章栏目：水污染防治

DOI 10.12030/j.cjee.202109021

中图分类号 X703.1

文献标识码 A

王文悦, 胡添焜, 于丽华, 等. 纳米氧化锌粒径效应对人工湿地运行性能的影响[J]. 环境工程学报, 2021, 15(12): 3895-3906.

WANG Wenyue, HU Tiantian, YU Lihua, et al. Size-dependent effects of ZnO nanoparticles on operational performance of constructed wetlands[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2021, 15(12): 3895-3906.

## 纳米氧化锌粒径效应对人工湿地运行性能的影响

王文悦<sup>1</sup>, 胡添焜<sup>2</sup>, 于丽华<sup>3</sup>, 马春云<sup>1</sup>, 孔范龙<sup>1</sup>, 王森<sup>1,✉</sup>

1. 青岛大学环境科学与工程学院, 青岛 266071

2. 宁波健益检测科技有限公司, 宁波 315303

3. 青岛市生态环境局莱西分局, 青岛 266600

第一作者: 王文悦(1997—), 女, 硕士研究生。研究方向: 人工湿地生态工程。E-mail: 2020025845@qdu.edu.cn

✉通信作者: 王森(1981—), 男, 博士, 副教授。研究方向: 人工湿地生态工程。E-mail: wangsen@qdu.edu.cn

**摘要** 为考察 ZnO NPs 粒径效应对人工湿地运行性能的影响, 在进水 COD 约为 216.00 mg·L<sup>-1</sup>、总氮约为 11.10 mg·L<sup>-1</sup> 和总磷约为 3.84 mg·L<sup>-1</sup> 的条件下连续运行 126 d, 对暴露于不同粒径 ZnO NPs(10.00 mg·L<sup>-1</sup>) 的人工湿地脱氮除磷性能、填料渗透系数、胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS) 产量和特性以及微生物群落结构和多样性的变化进行了研究。结果表明: 与对照组(未投加 ZnO NPs)相比, 进水中投加 15、50 和 90 nm ZnO NPs 后, 人工湿地对 COD 的去除率分别下降了 8.73%、7.55% 和 6.97%; 氨氮和总氮的去除率分别下降了 21.96% 和 10.95%、17.75% 和 10.00% 以及 15.34% 和 3.78%。高通量测序结果表明, ZnO NPs 粒径越小, 对硝化菌属 *Thauera* 的抑制作用越明显。投加 ZnO NPs 后, 其释放的 Zn<sup>2+</sup> 会与水中磷酸盐结合生成磷酸锌等不溶物, 同时会增加异养硝化菌 *Acinetobacter* 的相对丰度, 从而导致总磷的去除率比对照组提高了 42.49%~56.38%。此外, 与对照组(97.18 mg·g<sup>-1</sup>)相比, 投加 15、50 和 90 nm 的 ZnO NPs 后 EPS 的产量分别增加到 212.97、156.30 和 128.53 mg·g<sup>-1</sup>。EPS 分泌量的增大, 导致填料渗透系数快速降低, 在运行 83 d 后分别下降了 71.17%、67.83% 和 37.50%。

**关键词** 纳米氧化锌; 粒径效应; 人工湿地; 堵塞; 微生物群落

纳米氧化锌(ZnO nanoparticles, ZnO NPs)具有催化活性、强氧化性和高稳定性, 广泛应用于半导体、染料、塑料添加剂、化妆品等许多领域<sup>[1]</sup>。在 ZnO NPs 系列产品的生命周期中, 其不可避免地会进入生态系统<sup>[2]</sup>, 由其引发的生物安全性问题, 引起了学者们的广泛关注<sup>[3]</sup>。近年来, 在土壤、污水和污泥中均发现了 ZnO NPs 的存在。GOTTSCALK 等<sup>[4]</sup>通过建模模拟得出, 欧洲和美国水环境中的 ZnO NPs 质量浓度分别为 0.432 mg·L<sup>-1</sup> 和 0.3 mg·L<sup>-1</sup>, 已达到损害水体生物的阈值。部分进入环境中的 ZnO NPs 最终会进入到污水处理系统中<sup>[5]</sup>。因此, 有必要了解 ZnO NPs 对污水生物处理运行效果的影响。

人工湿地(constructed wetlands, CWs)具有运行成本低、无二次污染、景观价值高等优点, 已广泛应用于污水处理中<sup>[6-7]</sup>。然而, 在其长期运行过程中, 基质表面会堆积大量的难降解有机物和

收稿日期: 2021-09-04; 录用日期: 2021-10-25

基金项目: 山东省自然科学基金(ZR2020MD006, ZR2019MD042); 山东省高等学校科技计划项目(J18KA108)

微生物分泌的胞外聚合物 (extracellular polymeric substances, EPS), 同时 EPS 会吸附无机颗粒和有机物并形成致密的堵塞层, 造成 CWs 的堵塞<sup>[8]</sup>。有研究表明, ZnO NPs 溶解产生的  $Zn^{2+}$  以及 NPs 的内化会损伤细胞<sup>[9-10]</sup>, 且其粒径越小, 生物毒性越强<sup>[11]</sup>, 会刺激微生物产生更多的 EPS<sup>[12]</sup>。EPS 亲水组分可通过吸附 ZnO NPs, 降低其对微生物的生物毒性<sup>[13-14]</sup>。然而, 大量的 EPS 粘附于基质表面, 可能会降低基质层孔隙率<sup>[15-16]</sup>, 从而降低 CWs 的使用寿命。目前, 有关 ZnO NPs 的粒径效应对 CWs 性能及堵塞的影响尚缺乏系统的研究, 并且 ZnO NPs 的粒径与微生物相对丰度的关系尚未明确。

针对上述问题, 本研究考察了 3 种不同粒径 (15 nm、50 nm 和 90 nm) 的 ZnO NPs 对 CWs 性能、渗透系数及 EPS 产量和特性的影响, 探讨了微生物群落结构和多样性对不同粒径 ZnO NPs 的响应, 以期为 CWs 的稳定运行提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 ZnO NPs 悬浊液配制

称取 0.5 g ZnO NPs(表 1) 于 1 L 超纯水中, 用磁力搅拌器混合搅拌 30 min 后, 装入棕色试剂瓶中。在 25 °C 下, 超声 1 h<sup>[17]</sup>, 制得 ZnO NPs 悬浊液。使用前, 悬浊液需超声 1 h(25 °C, 500 W, 40 kHz), 防止 ZnO NPs 团聚。

表 1 ZnO NPs 基本参数  
Table 1 Basic parameters of ZnO NPs

粒径/nm	颜色、状态	纯度/%	比表面积/(m <sup>2</sup> ·g <sup>-1</sup> )	生产厂家
15	白色粉末	99.9	110	南京埃普瑞纳米材料有限公司
50	淡黄色/白色粉末	99.8	15~30	杭州万景新材料有限公司
90	淡黄色/白色粉末	99.8	10~20	杭州万景新材料有限公司

### 1.2 实验装置

构建 4 组实验室规模的水平潜流人工湿地系统 (horizontal subsurface flow constructed wetland, HSFCWs), 具体构造见图 1。CWs 反应器为 PP 材质 (长、宽、高分别为 26.5、26.5、37 cm) 自下而上分别为 2 cm 细沙、17 cm 砾石 (粒径约 10~30 mm)、细丝网 (80 目)、8 cm 细沙和 9 株高约 30 cm、生长状态均一的香蒲。为保证实验结果稳定可靠, 在种入反应器前, 先将香蒲放入内有 1/4 浓度的霍格兰氏植物培养液的塑料箱中, 在 25 °C 下培养驯化 10 d 左右。

### 1.3 接种污泥和进水水质

分别以乙酸钠、氯化铵、磷酸二氢钾和磷酸氢二钾作为碳源、氮源和磷源配制人工污水, 其 COD、TN 和 TP 分别约为 216.00、11.10 和 3.84 mg·L<sup>-1</sup>。配水中添加 1.00 mL·L<sup>-1</sup> 微量元素, 包括 0.83 mg·L<sup>-1</sup> KI、6.20 mg·L<sup>-1</sup> 硼酸、22.30 mg·L<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub>、8.60 mg·L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>、0.025 mg·L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>、0.025 mg·L<sup>-1</sup> CoCl<sub>2</sub>、5.56 g·L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 和 7.46 g·L<sup>-1</sup> EDTA。使用 1 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸或氢氧化钠调节进水 pH 在 7.4 左右。反应器进水为下进上出, 水力停留时间 (HRT) 为 2 d。

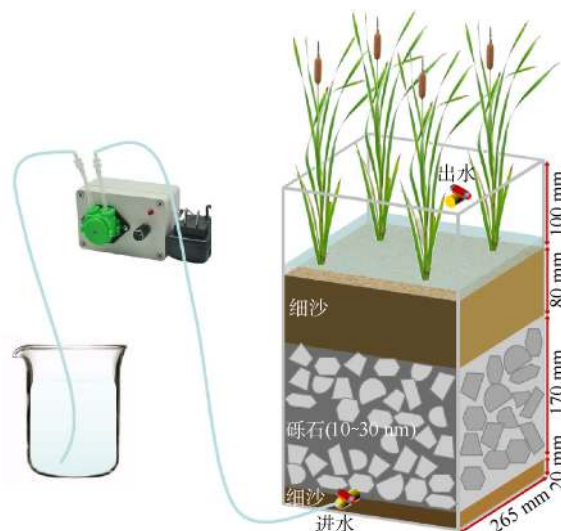


图 1 实验装置构造示意图

Fig. 1 Schematic of CWs

在填充到反应器前, 利用青岛市李村河污水处理厂二沉池回流污泥作为接种污泥对砾石进行挂膜。将砾石没入污泥中, 闷曝 3 d, 然后以人工污水作为进水, 连续运行 15 d 左右。待砾石表面附着生物膜后, 将其填入反应器内, 每日投配定量人工污水。在运行过程中, 测定 COD、TP、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和 TN 等指标。反应器达到稳定去除效果 10 d 后, 开始在进水中投加 ZnO NPs。ZnO NPs 的环境本底值约为  $1.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 考虑到 ZnO NPs 在环境中累积且不易降解的情况, 本实验投加的 ZnO NPs 质量浓度为  $10.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。反应器设置 1 组对照, 即 CW-对照 (不投加 ZnO NPs) 和 3 组实验组, 包括 CW-15 (15 nm ZnO NPs)、CW-50 (50 nm ZnO NPs) 和 CW-90 (90 nm ZnO NPs)。

#### 1.4 水质指标测定方法

实验期间, 每隔 1 d 对 4 个反应器的进出水进行取样, 利用重铬酸钾法测定 COD, 纳氏试剂分光光度法测定  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ , 碱性过硫酸钾消解法测定 TN 和钼锑抗分光光度法测定 TP<sup>[18]</sup>。

#### 1.5 水力传导性测量方法

CWs 反应器连续进水, 并处于饱和状态。采用常水头渗透系数法<sup>[19]</sup>, 测定 Cws 整体基质层的渗透系数, 根据式 (1) 进行计算。

$$K = \frac{QL}{A(\Delta H + L)t} \quad (1)$$

式中:  $K$  为渗透系数,  $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ;  $Q$  为单位时间水渗透量,  $\text{mL}\cdot\text{s}^{-1}$ ;  $\Delta H$  为水头损失,  $\text{cm}$ ,  $\Delta H = H_1 - H_2$ ;  $A$  为过水断面面积,  $\text{cm}^2$ ;  $L$  为渗透路径长度,  $\text{cm}$ ;  $t$  为实验持续时间,  $\text{s}$ 。

#### 1.6 EPS 提取和分析方法

1) EPS 提取和测定。待反应器停止运行后, 从 Cws 顶部基质层收集 20.0 g 填料, 用 100 mL 的 NaCl (0.9%) 溶液冲洗后, 将得到的滤液倒入已灼烧至恒重的坩埚中在  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  下蒸干, 然后再放入马弗炉在  $600 \text{ }^\circ\text{C}$  下烧灼 3 h, 最后等坩埚冷却至恒重后测定堵塞物的质量。EPS 采用改进的加热法进行提取<sup>[20]</sup>, 取 40 mL 的堵塞物混合液于  $4\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min, 倒掉上清液后加入 NaCl (0.05%,  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ ) 溶液至 40 mL, 混匀后于  $4\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min, 所得上清液用  $0.45 \text{ }\mu\text{m}$  的聚醚砜膜过滤后即为疏松附着型胞外聚合物 (loosely bound EPS, LB-EPS); 取 LB-EPS 离心后的沉淀物, 加入 NaCl (0.05%,  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ ) 溶液至 40 mL, 充分混合后在  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  下加热 30 min, 于  $4\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min, 所得上清液用  $0.45 \text{ }\mu\text{m}$  的聚醚砜膜过滤后即为紧密结合型胞外聚合物 (tightly bound EPS, TB-EPS)。LB-EPS 和 TB-EPS 中蛋白质 (proteins, PN) 和多糖 (polysaccharides, PS) 的含量分别通过 Folin 比色法<sup>[21]</sup> 和蒽酮-硫酸比色法<sup>[22]</sup> 测定。

2) 三维荧光光谱分析。采用荧光分光光度计 (日立 F-4600) 测定 LB-EPS 和 TB-EPS 的三维荧光激发发射矩阵光谱 (3D-EEM)。以蒸馏水作为空白对照, 测定参数设置如下: 激发波长 (Ex) 为 200~400 nm, 扫描间隔 5 nm; 发射波长 (Em) 为 200~500 nm, 扫描间隔为 5 nm; 激发光和发射光的狭缝均为 10 nm, 扫描速度为  $2\,400 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$ <sup>[23]</sup>。

#### 1.7 16S rRNA 高通量测序及结果分析

实验结束后, 采集每个反应器不同高度的基质约 100.00 g, 混合后放入磷酸盐缓冲溶液 (10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $8.50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl), 在超声波清洗机中 (KQ-500B) 处理 5 min, 然后涡漩 1 min, 将微生物从填料表面分离到溶液中。经离心处理后, 微生物样品送往上海派森诺生物科技有限公司进行 Illumina MiSeq/NovaSeq 高通量测序。

#### 1.8 数据分析

实验数据统计分析采用 SPSS 23.0 软件进行方差齐性检验和单因素方差分析 (采用邓肯多量程检验,  $P < 0.05$  视为具有显著性差异); 采用 Canoco 5 软件进行冗余分析 (redundancy analysis, RDA) 研究微生物群落和环境因子之间的关系; 采用 Matlab 2018a 软件绘制 3D-EEM 光谱图, 去除拉曼散



射和瑞利散射, 并进行归一化处理; 采用 OriginLab 2021 和 R 语言 (4.0.4) 绘图及数据分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 ZnO NPs 粒径对 CWs 处理性能的影响

系统稳定运行 45 d 后, 在进水中投加  $10.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  不同粒径的 ZnO NPs 悬浊液。如图 2(a) 所示, 在投加  $10.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  不同粒径的 ZnO NPs 前, CW-对照、CW-15、CW-50 和 CW-90 对 COD 的去除率分别为 88.70%、91.40%、92.47% 和 95.01%; 投加 ZnO NPs 39 d 后, 与不加 ZnO NPs 的空白对照组相比, CW-15、CW-50 和 CW-90 对 COD 的平均去除率均有不同程度的下降, 分别为 8.73%、7.55% 和 6.97%。这表明较小粒径的 ZnO NPs 对 COD 的去除产生较明显的抑制作用。其原因可能归结于以下 2 点: ZnO NPs ( $10.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 释放出的  $\text{Zn}^{2+}$  离子具有生物毒性, 导致异养微生物对 COD 的去除率下降<sup>[24]</sup>; 小粒径 ZnO NPs 与微生物细胞具有更大的接触面积<sup>[25]</sup>, 对异养微生物的生物代谢抑制更加明显, 从而降低 COD 的去除率。

如图 2(b) 所示, 在投加 ZnO NPs 28 d 后, CW-15、CW-50 和 CW-90 对  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  的去除率呈降低趋势。与空白对照组相比, CW-15、CW-50 和 CW-90 对  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  的去除率分别下降了 21.96%、17.75% 和 15.34%。CWs 对  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  的去除主要在微生物吸收消耗有机营养物的硝化过程中, 随着系统进入堵塞阶段, 好氧环境受抑制 (堵塞后 DO 在  $0.08\text{-}0.21 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 硝化细菌的活性降低, 不利于  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  的去除。

如图 2(c) 所示, 投加 ZnO NPs 后, CW-对照、CW-15、CW-50 和 CW-90 对 TN 的去除率呈现先增加后降低的趋势。这可能是因为: 反应前期 ZnO NPs 释放的低浓度的  $\text{Zn}^{2+}$  会提高厌氧氨氧化菌 (anaerobic-oxidizing bacteria, AOB) 的代谢活性, 从而消耗反应器中剩余的亚硝酸盐, 降低了 TN 的

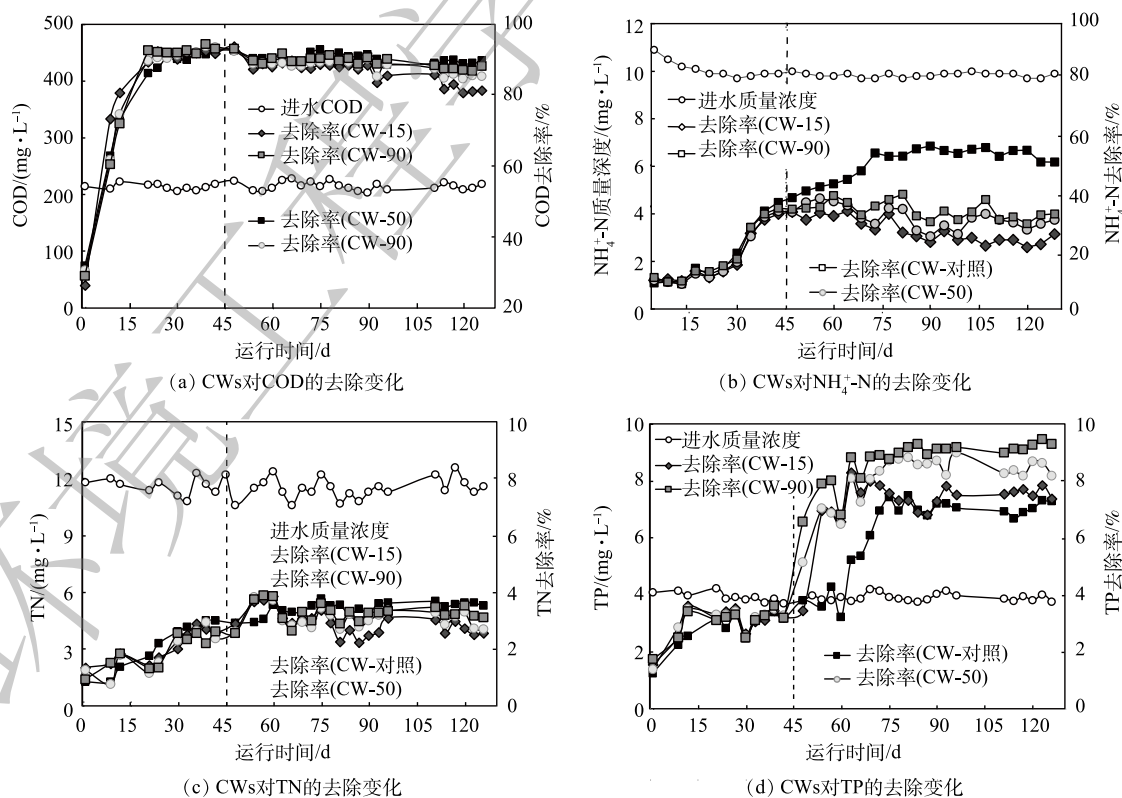


图 2 不同粒径的 ZnO NPs 短期暴露对 CWs COD、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、TN 和 TP 去除效果的影响

Fig. 2 Effect of short-term exposure of ZnO NPs with different particle sizes on COD,  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ , TN, and TP removal by CWs

浓度<sup>[26]</sup>。然而, 在投加 ZnO NPs 24 d 后, 与空白对照组相比, CW-15、CW-50 和 CW-90 对 TN 的去除率分别下降了 10.95%、10.00% 和 3.78%。

如图 2(d) 所示, 在投加 ZnO NPs 18 d 后, CW-15、CW-50 和 CW-90 对 TP 的去除率有不同程度的增加, 分别为 42.49%、52.34% 和 56.38%。可以推测, 随着堵塞的发生, 基质中积累的 EPS 作为堵塞物的关键成分, 引入了大量的磷吸附位点。此外, ZnO NPs 释放的  $Zn^{2+}$  与磷酸盐反应生成磷酸锌等络合物, 也会抑制磷酸盐的释放<sup>[12]</sup>, 从而提高了 CWs 的除磷性能。

## 2.2 ZnO NPs 粒径对 CWs 堵塞的影响

1) CWs 渗透系数的变化。进水中连续投加不同粒径的 ZnO NPs, 稳定运行 83 d 后, 4 个 CWs 发生了不同程度的堵塞。如表 2 所示, CW-对照组的渗透系数维持在  $1.20 \times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ , 而 CW-15、CW-50 和 CW-90 基质层的渗透系数明显变小, 分别比 CW-对照降低了 71.17%、67.83% 和 37.50%。随着 ZnO NPs 在 CWs 中的累积, 导致系统水流阻力增大, 出现短流、返混等现象, 从而缩短 HRT。同时, CWs 处理性能的下降导致营养物质不断积累, 再加上 ZnO NPs 刺激微生物产生的 EPS 不断增多, 加剧了堵塞的程度。

2) EPS 和 PN 和 PS 产量的变化。有研究<sup>[27]</sup>表明, 当微生物暴露于 ZnO NPs 等有毒物质下会产生应激反应并促进 EPS 的分泌。污泥絮体表面的 EPS 可以吸附 ZnO NPs 颗粒从而阻止其扩散到微生物中<sup>[28]</sup>。如图 3(a) 所示, 与对照组 ( $97.18 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 相比, CW-15、CW-50 和 CW-90 中的 EPS 分别增加到 212.97、156.30 和 128.53  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。15 nm 的 ZnO NPs 可刺激微生物分泌 EPS 的量最多, 这主要是因为小粒径的 ZnO NPs 比表面积大, 更易于与微生物接触。有研究<sup>[29]</sup>表明, 8 nm 的 ZnO NPs 对金黄色葡萄球菌生长的抑制性强于 50~70 nm ZnO NPs。此外, 溶出的  $Zn^{2+}$  会损伤细胞膜和 DNA 结构, 可进一步诱导微生物持续分泌 EPS<sup>[30]</sup>。

EPS 主要由 PN、PS 以及少量核酸和脂质组成<sup>[12]</sup>。短期暴露于不同粒径的 ZnO NPs 后, LB-EPS(图 3(b)) 和 TB-EPS(图 3(c)) 中 PN 和 PS 含量显著升高, 尤以 CW-15 最为显著。这主要是因为小粒径的 ZnO NPs 毒性更强, 易刺激微生物分泌更多的 EPS。此外, ZnO NPs 的短期暴露可能导致了大量生物量衰减和大量细胞破裂<sup>[31]</sup>, 从而使 PN 和 PS 含量大幅增加。

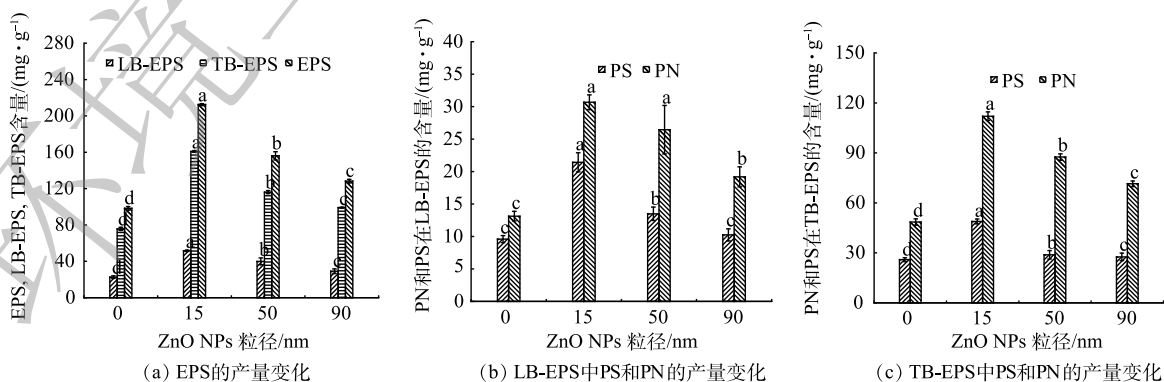


图 3 不同粒径的 ZnO NPs 短期暴露下 EPS、PN 和 PS 的含量变化

Fig. 3 Changes in EPS, PN, and PS content of ZnO NPs with different particle sizes after short-term exposure

3) LB-EPS 和 TB-EPS 主要组分分析。由图 4 可以看出, 投加 ZnO NPs 前后 LB-EPS 和 TB-EPS 中识别出 4 个特征峰(峰 A~D), 其中峰 A(200 nm/290~300 nm) 为芳香族类蛋白质, 峰 B(220~230 nm/300~330 nm) 为类色氨酸物质, 峰 C(270~280 nm/300~330 nm) 为类可溶性微生物副产物, 而峰 D(270 nm/420 nm) 为类胡敏酸物质<sup>[32]</sup>。CW-对照和 CW-15 的 LB-EPS 主要为芳香族类蛋白和类胡敏酸物质, CW-50 和 CW-90 的 LB-EPS 中峰 D 被峰 C 取代, 这说明由于微生物的作用, 可溶性微生物代谢副产物峰明显增强。同时, CW-50 的峰 C 出现红移, 表明某些官能团(如羰基、羟基、氨基和羧基)的含量增多。TB-EPS 主要为芳香族类蛋白、类色氨酸物质和类可溶性微生物副产物, 并未发现类胡敏酸物质。TB-EPS 的组成成分未发生显著变化, 可能是由于其位于内层, 在 LB-EPS 的保护下未受到大的影响。这进一步说明, EPS 的主要组分受到了 ZnO NPs 尺寸效应的影响。

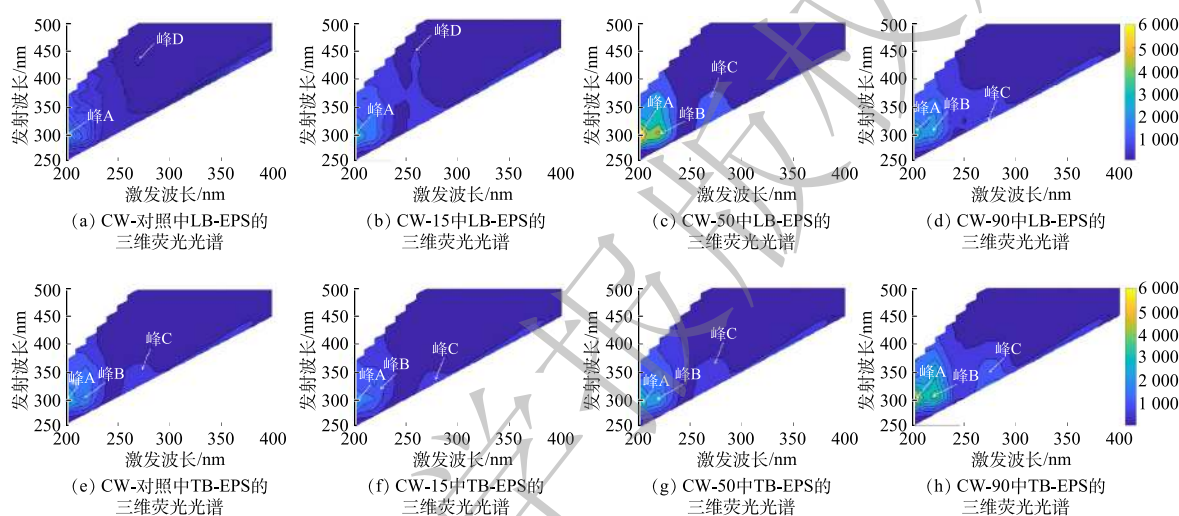


图 4 不同粒径的 ZnO NPs 短期暴露 LB-EPS 和 TB-EPS 三维荧光光谱

Fig. 4 3D-EEM of LB-EPS and TB-EPS after short-term exposure of ZnO NPs with different particle sizes

### 2.3 ZnO NPs 粒径对微生物群落丰度和多样性的影响

1) 微生物群落丰度和多样性差异分析。通过 Illumina MiSeq 平台测序, 进一步考察了不同粒径的 ZnO NPs 对微生物群落结构和多样性影响。如表 3 所示, 4 组样本在最低测序深度序列量为 95% 的条件下, 测序深度指数稳定在 0.995~0.998, 说明测序已检测绝大多数物种。通过 Chao1 和物种指数评价微生物群落丰富度, 其大小顺序为 CW-15>CW-50>CW-对照>CW-90。Simpson 和 Shannon 指数常用于评估微生物多样性<sup>[33]</sup>。投加 ZnO NPs 后可刺激微生物产生应激反应, 从而促进微生物多样性地增加<sup>[34]</sup>。在 4 个反应器中, CW-15 中 Simpson 和 Shannon 指数均最低。这说明小粒径的 ZnO NPs 会对微生物产生更强的毒性, 降低微生物群落结构多样性<sup>[35]</sup>, 从而影响系统的稳定性。

表 3 不同粒径的 ZnO NPs 短期暴露下微生物群落的丰富度和多样指数

Table 3 Richness and diversity index of the microbial community after short-term exposure of ZnO NPs with different particle sizes

粒径/nm	Chao1指数	物种指数	Simpson指数	Shannon指数	测序深度指数
对照	4 359.01	4 280.9	0.992	9.326	0.996
15	4 740.83	4 707.9	0.980	9.183	0.998
50	4 488.43	4 357.2	0.995	9.434	0.995
90	4 302.15	4 253.5	0.996	9.750	0.997



如图 5(a) 所示, 4 组样品的总 OTUs 为 12 085 个, 其中共有 787 个, 占总 OTUs 的 6.51%。如图 5(b) 所示, 4 组样品共有的 OTUs 中微生物中最优势菌门为变形菌门 (*Proteobacteria*) 相对丰度占微生物总量的 51.50%, 其次是拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、绿弯杆菌门 (*Chloroflexi*)、浮霉菌门 (*Planctomycetes*) 和放线菌门 (*Acidobacteria*), 占微生物总量的比例依次为 15.15%、11.46%、4.66% 和 4.19%。CW-对照、CW-15、CW-50、CW-90 中独有的 OTUs 分别为 2 006、2 063、2 973 和 1 997 个, 说明不同粒径的 ZnO NPs 对微生物群落产生了差异性的影响。有研究<sup>[36]</sup>表明, *Proteobacteria*、*Bacteroidetes*、*Chloroflexi* 和 *Acidobacteria* 为 CWs 底泥中的优势菌种。*Proteobacteria* 中大多为革兰氏阴性菌, 为兼性或专性厌氧菌, 参与厌氧消化反应和氮的循环<sup>[37-38]</sup>。*Bacteroidetes* 专性厌氧, 可以降解纤维素、淀粉、蛋白质和脂类等大分子有机物, 并参与自养反硝化<sup>[39]</sup>。此外, *Proteobacteria* 和 *Bacteroidetes* 能够分泌脂多糖, 有助于微生物粘附到生物载体表面<sup>[40]</sup>。因此, 短期暴露于不同粒径的 ZnO NPs 会影响 *Proteobacteria*、*Bacteroidetes* 的丰度, 这也是导致 CWs 中 COD、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和 TN 的去除率降低和 EPS 含量增加的主要影响因素之一。

PCoA 是基于 Unweighted UniFrac 距离指标来考察物种间进化距离和多样性相异系数, 其值越小进化距离和差异性越小。如图 6(a) 所示, 主成分 1 和主成分 2 分别占微生物群落结构变异的 42.10% 和 30.10%。CW-50 和 CW-90 之间的多样性差异性最小, 二者分别与 CW-15 和 CW-对照相比, 多样性存在明显差异, 说明不同粒径的 ZnO NPs 导致微生物群落多样性之间存在一定差异性。

为了更好地了解不同粒径的 ZnO NPs 对 CWs 系统内微生物群落结构的影响, 对 4 个样本进行了属水平的分析 (图 6(b))。属水平微生物相对丰度中 *Thauera*、*Burkholderiaceae*、*Acinetobacter* 和 *Nitrosomonas* 为优势菌属。CWs 系统脱氮主要通过硝化作用、反硝化作用和氨化作用等协同实现<sup>[41]</sup>。硝化菌属主要为 *Acinetobacter*、*Nitrosomonas* 和 *Candidatus*, 在 4 个系统 (CW-对照、CW-15、CW-50 和 CW-90) 中所占比例分别为 14.18%、10.05% 和 6.44%, 反硝化菌属主要包括 *Thauera*、*Burkholderiaceae* 和 *Caldilineaceae*, 在 4 个系统中所占比例分别为 21.34%、16.47% 和 9.37%。其中 *Thauera* 是广泛存在的自养和异养反硝化的功能菌<sup>[42-43]</sup>, 尽管在高 C/N 的进水条件下异养反硝化菌占绝对优势, 但 ZnO NPs 对 *Thauera* 有明显抑制作用, 因而进一步抑制了 CWs 的反硝化效果。*Acinetobacter* 具有脱氮除磷功能<sup>[44-45]</sup>, 能在异养硝化去除  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  的同时实现磷的去除<sup>[46-47]</sup>。CW-15 中 *Acinetobacter* 的相对丰度较对照组增加了 13.12%, 显示出良好的除磷能力。4 个系统内反硝化菌属的相对丰度显著高于硝化菌属, 故可推测, 硝化过程可能为 CWs 脱氮的主要限制性因素<sup>[48]</sup>。在进水 C/N 较高的条

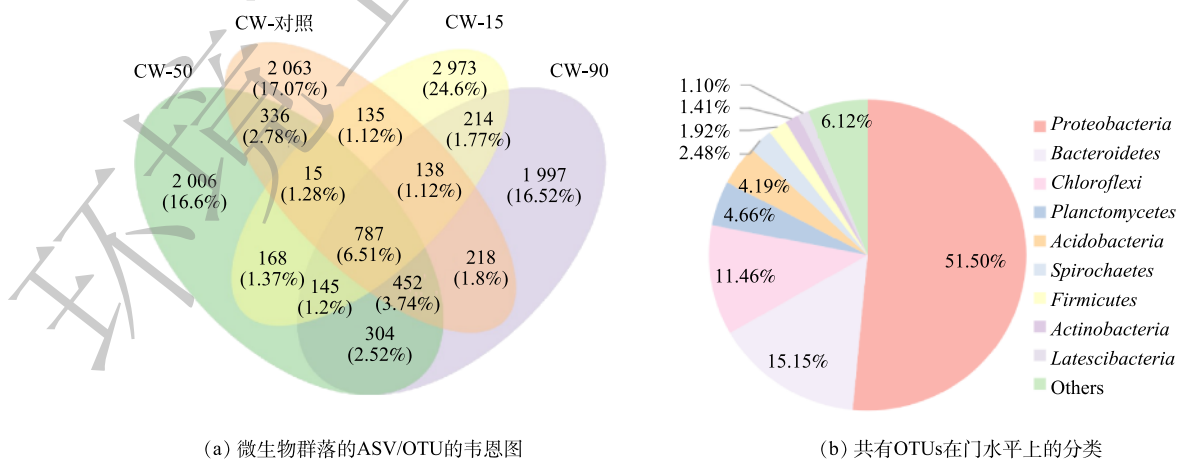


图 5 不同粒径的 ZnO NPs 短期暴露下微生物群落的 ASV/OTU 的韦恩图

Fig. 5 Venn of ASV/OTU of the microbial community after short-term exposure of ZnO NPs with different particle sizes

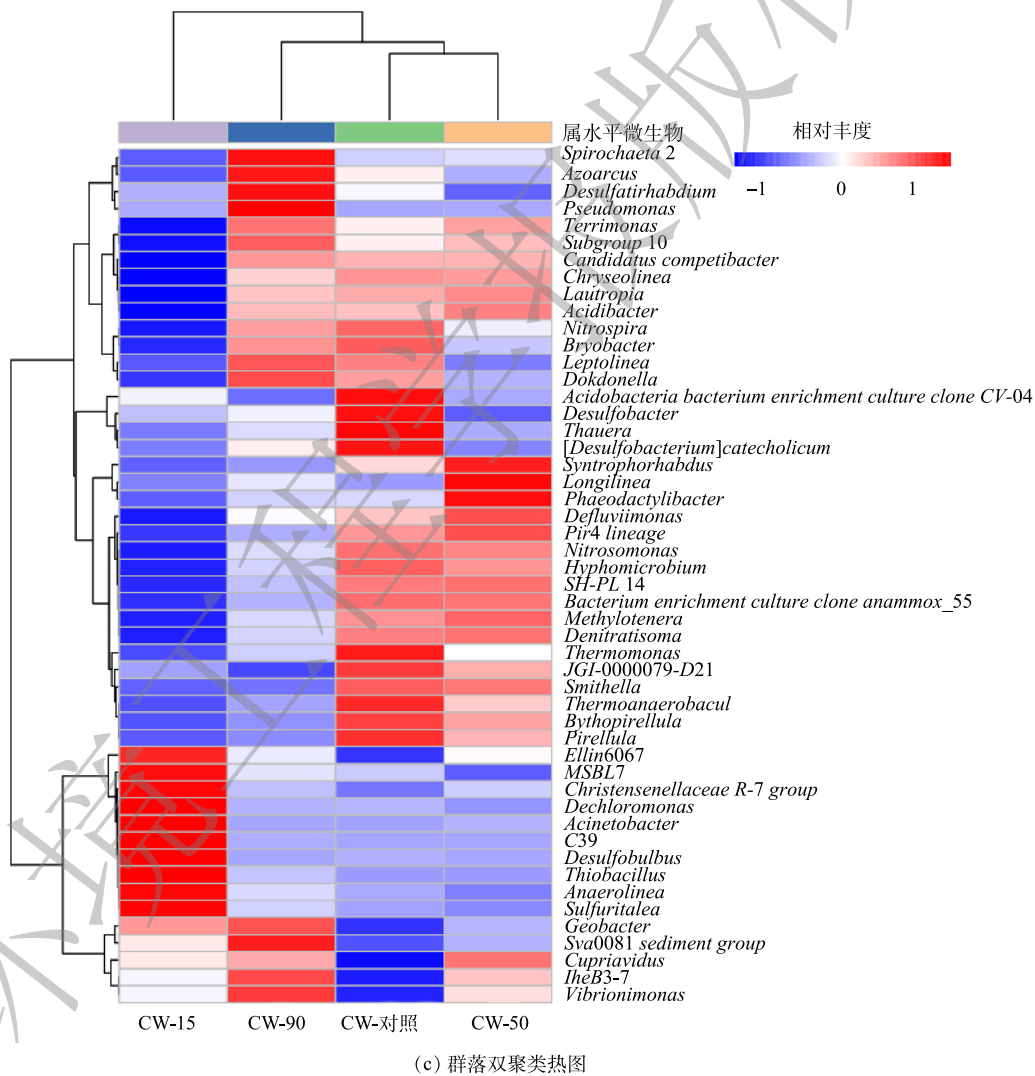
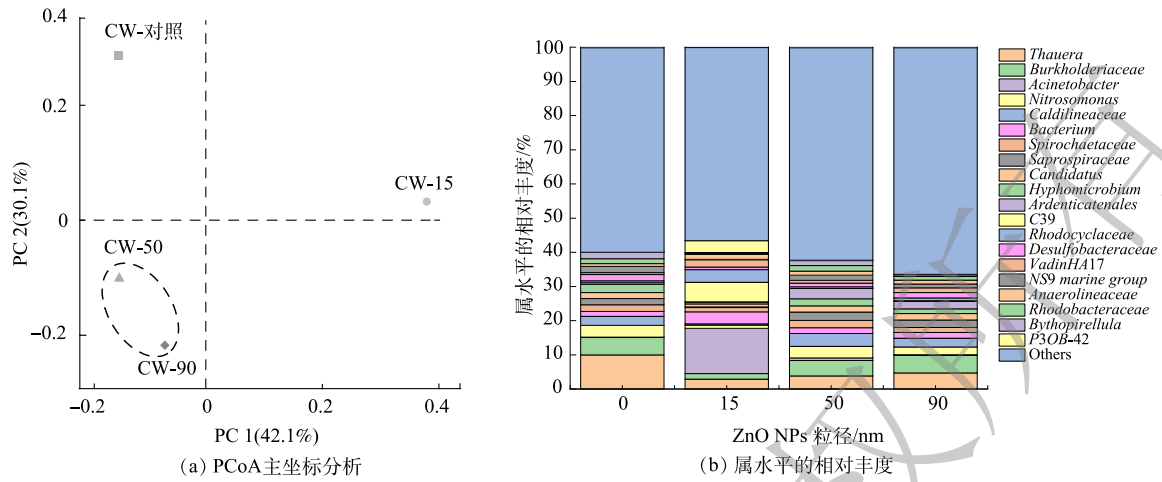


图 6 不同粒径的 ZnO NPs 短期暴露下对 CWs 内微生物群落的影响

Fig. 6 Effect of short-term exposure of ZnO NPs with different particle sizes on microbial community in CWs

件下，微生物分泌大量的 EPS 导致基质层渗透系数降低，在系统中产生缺氧或厌氧环境，从而有



利于异养反硝化菌的生长，硝化菌属活性则受到抑制。此外，ZnO NPs 及其释放的  $Zn^{2+}$  会引起微生物体内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的增加，引起细胞膜的损伤<sup>[49-50]</sup>，从而降低 CWs 系统的脱氮性能。

由属水平热图聚类结果可知，样本中含有的菌群丰度差异性 (图 6(c))。CW-对照与 CW-50 的物种组成相似性较高，而与 CW-15 的差异性最大。不同粒径的 ZnO NPs 均降低了 *Thauera*、*Desulfobacter* 和 *Thermomonas* 的相对丰度，使其变成非优势菌。同时，CW-15 中优势微生物群落组成相比于其他组差异性较大，其中 *Acinetobacter*、C39 和 *Desulfobulbus* 等 10 种优势菌属具有较高的相对丰度，这些优势菌对 15 nm 的 ZnO NPs 表现出极大的耐受性，但在 50 nm 和 90 nm ZnO NPs 存在的条件下受到不同程度的抑制。投加不同粒径的 ZnO NPs 后，CWs 中微生物群落的变化导致其性能也有所不同。

2) 微生物与环境因子的关系。如图 7 所示，RDA 反映了属水平微生物与环境因子各组分之间的关系。根据蒙特卡洛置换检验，结果具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )<sup>[51]</sup>，且第 1 与第 2 坐标轴的方差解释率占总方差的 97.31%。由图 7 可以看出，ZnO NPs 的粒径与 *Caldilineaceae*、*Spirochaetaceae*、*Saprospiraceae*、*Candidatus*、*Nitrosomonas*、*Burkholderiaceae* 和 *Hyphomicrobium* 均呈正相关，与 *Caldilineaceae* 的相关性最大。COD、 $NH_4^+-N$ 、TN 和 TP 与上述关系相反。因此，ZnO NPs 的粒径效应对属水平微生物的相对丰度有着不同程度的影响。

### 3 结论

1) ZnO NPs ( $10.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 对 COD、 $NH_4^+-N$  和 TN 的去除具有明显的粒径效应，其粒径越小，对去除效果的抑制作用越明显；而 ZnO NPs ( $10.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 对 TP 的去除有促进作用，粒径越大，其促进效果越明显。

2) ZnO NPs 粒径越小，刺激微生物分泌 EPS 的量越多，CWs 的渗透系数下降越明显；同时，ZnO NPs 对 LB-EPS 和 TB-EPS 的含量和组成成分产生了不同程度的影响，15 nm 的 ZnO NPs 对类蛋白质物质有明显抑制作用。

3) 短期暴露于不同粒径的 ZnO NPs 后，CWs 中微生物群落结构和多样性可产生显著的差异性；前 10 种属水平的优势菌属中，与粒径呈正相关的菌属占比为 70%。

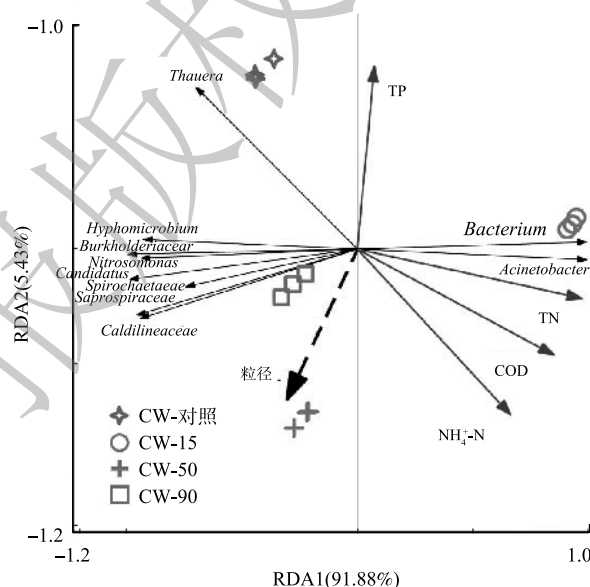


图 7 不同粒径的 ZnO NPs 短期暴露下环境因子与属水平微生物的冗余分析 (RDA) ( $P < 0.05$ )

Fig. 7 RDA of environmental factors and genus level microorganisms under the short-term exposure of ZnO NPs with different particle sizes ( $P < 0.05$ )

## 参考文献

- [1] ZHENG X, WU R, CHEN Y G. Effects of ZnO nanoparticles on wastewater biological nitrogen and phosphorus removal[J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(7): 2826-2832.
- [2] ZHANG Z Z, CHENG Y F, XU L Z J, et al. Transient disturbance of engineered ZnO nanoparticles enhances the resistance and resilience of anammox process in wastewater treatment[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 622-623: 402-409.
- [3] SU H, WANG Y F, GU Y L, et al. Potential applications and human biosafety of nanomaterials used in nanomedicine[J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2017, 38: 3-24.
- [4] GOTTSCHALK F, SONDERER T, SCHOLZ R W, et al. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions[J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(24): 9216-9222.
- [5] PUAY N Q, QIU G, TING Y P. Effect of zinc oxide nanoparticles on biological wastewater treatment in a sequencing batch reactor[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2015, 88: 139-145.
- [6] WU Y H, HAN R, YANG X N, et al. Correlating microbial community with physicochemical indices and structures of a full-scale integrated constructed wetland system[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100: 6917-6926.
- [7] 林莉莉, 鲁汕, 肖恩荣, 等. 人工湿地生物堵塞研究进展[J]. *环境科学与技术*, 2019, 42(6): 207-214.
- [8] YE J, LI H, ZHANG C, et al. Classification and extraction methods of the clog components of constructed wetland[J]. *Ecological Engineering*, 2014, 70: 327-331.
- [9] FRANKLIN N M, ROGERS N J, APTE S C, et al. Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl<sub>2</sub> to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): Importance of particle solubility[J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(24): 8484-8490.
- [10] HE E, QIU R, CAO X, et al. Elucidating toxicodynamic differences at the molecular scale between ZnO NPs and ZnCl<sub>2</sub> in *Enchytraeus crypticus* via nontargeted metabolomics[J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54: 3487-3498.
- [11] SILVA B L D, CAETANO B L, CHIARI-ANDRÉO B G, et al. Increased antibacterial activity of ZnO nanoparticles: Influence of size and surface modification[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2019, 177: 440-447.
- [12] WANG S, GAO M C, MA B R, et al. Size-dependent effects of ZnO nanoparticles on performance, microbial enzymatic activity and extracellular polymeric substances in sequencing batch reactor[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 257: 113596.
- [13] WEI L L, DING J, XUE M, et al. Adsorption mechanism of ZnO and CuO nanoparticles on two typical sludge EPS: Effect of nanoparticle diameter and fractional EPS polarity on binding[J]. *Chemosphere*, 2019, 214: 210-219.
- [14] KISER M A, RYU H, JANG H Y, et al. Biosorption of nanoparticles to heterotrophic wastewater biomass[J]. *Water Research*, 2010, 44: 4105-4114.
- [15] SAMSÓ R, GARCÍA J, MOLLE P, et al. Modelling bioclogging in variably saturated porous media and the interactions between surface/subsurface flows: Application to constructed wetland[J]. *Journal of Environmental Management*, 2016, 165: 271-279.
- [16] MATOS M D, SPERLING M V, MATOS A D. Clogging in horizontal subsurface flow constructed wetlands: Influencing factors, research methods and remediation techniques[J]. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2018, 17(1): 87-107.
- [17] KELLER A A, WANG H T, ZHOU D X, et al. Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural aqueous matrices[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(6): 1962-1967.
- [18] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [19] ZHAO L F, ZHU W, TONG W. Clogging processes caused by biofilm growth and organic particle accumulation in lab-scale vertical flow constructed wetlands[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2009, 6: 40-47.
- [20] LI X Y, YANG S F. Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of activated sludge[J]. *Water Research*, 2007, 41: 1022-1030.
- [21] MIAO L Z, WANG C, HOU J, et al. Response of wastewater biofilm to CuO nanoparticle exposure in terms of extracellular polymeric substances and microbial community structure[J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 579: 588-597.
- [22] WANG Z, GAO M, WEI J, et al. Long-term effects of salinity on extracellular polymeric substances, microbial activity and microbial community from biofilm and suspended sludge in an anoxic-aerobic sequencing batch biofilm reactor[J]. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2016, 68: 275-280.
- [23] 王雪礁, 王森, 李姗姗, 等. 二氧化钛纳米颗粒对序批式反应器中活性污泥胞外聚合物产量及其组分的影响[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2018, 48(4): 111-119.
- [24] CHEN L, HU Q Z, ZHANG X, et al. Effects of ZnO nanoparticles on the performance of anaerobic membrane bioreactor: An attention to the characteristics of supernatant, effluent and biomass community[J]. *Environmental Pollution*, 2019, 248: 743-755.
- [25] SHARIFI S, BEHZADI S, LAURENT S, et al. Toxicity of nanomaterials[J]. *Chemical Society Review*, 2012, 41(6): 2323-2343.
- [26] ZHANG X J, ZHANG N, FU H Q, et al. Effect of zinc oxide nanoparticles on nitrogen removal, microbial activity and microbial community of CANON process in a membrane bioreactor[J].

- [Bioresource Technology](#), 2017, 243: 93-99.
- [27] MA B R, LI Z W, WANG S, et al. Insights into the effect of nickel (Ni(II)) on the performance, microbial enzymatic activity and extracellular polymeric substances of activated sludge[J]. [Environmental Pollution](#), 2019, 251: 81-89.
- [28] DIMKPA C O, CALDER A, GAJJAR P, et al. Interaction of silver nanoparticles with an environmentally beneficial bacterium, *Pseudomonas chlororaphis*[J]. [Journal of Hazardous Materials](#), 2011, 188(1/2/3): 428-435.
- [29] JONES N, RAY B, RANJIT K T, et al. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms[J]. [FEMS Microbiology Letters](#), 2010(1): 71-76.
- [30] 郑晓英, 吴颜科, 陈卫, 等. Zn(II)长期作用对好氧颗粒污泥脱氮和微生物活性的影响[J]. [水处理技术](#), 2014, 40(6): 24-28.
- [31] ZHANG D Q, ENG C Y, STUCKEY D C, et al. Effects of ZnO nanoparticle exposure on wastewater treatment and soluble microbial products (SMPs) in an anoxic-aerobic membrane bioreactor[J]. [Chemosphere](#), 2017, 171: 446-459.
- [32] CHEN W, WESTERHOFF P, LEENHEER J A, et al. Fluorescence excitation-emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter[J]. [Environmental Science & Technology](#), 2015, 37(24): 5701-5710.
- [33] KONG Q, HE X, MA S S, et al. The performance and evolution of bacterial community of activated sludge exposed to trimethoprim in a sequencing batch reactor[J]. [Bioresource Technology](#), 2017, 244: 872-879.
- [34] LIN W X, SUN S Y, WU C, et al. Effects of toxic organic flotation reagent (aniline afloat) on an A/O submerged membrane bioreactor (sMBR): Microbial community dynamics and performance[J]. [Ecotoxicology and Environmental Safety](#), 2017, 142: 14-21.
- [35] GE Y, SCHIMMEL J P, HOLDEN P A. Evidence for negative effects of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles on soil bacterial communities[J]. [Environmental Science & Technology](#), 2011, 45(4): 1659-1664.
- [36] CHEN Y, WEN Y, TANG Z R, et al. Effects of plant biomass on bacterial community structure in constructed wetlands used for tertiary wastewater treatment[J]. [Ecological Engineering](#), 2015, 84: 38-45.
- [37] WANG Q, LV R Y, RENE E R, et al. Characterization of microbial community and resistance gene (CzcA) shifts in up-flow constructed wetlands-microbial fuel cell treating Zn (II) contaminated wastewater[J]. [Bioresource Technology](#), 2020, 302(18): 122867.
- [38] JIANG Y, WEI L, YANG K, et al. Rapid formation of aniline-degrading aerobic granular sludge and investigation of its microbial community succession[J]. [Journal of Cleaner Production](#), 2017, 166: 1235-1243.
- [39] CHEN D, WANG H, YANG K, et al. Performance and microbial communities in a combined bioelectrochemical and sulfur autotrophic denitrification system at low temperature[J]. [Chemosphere](#), 2018, 193: 337-342.
- [40] PENG P, HUANG H, REN H. Effect of adding low-concentration of rhamnolipid on reactor performances and microbial community evolution in MBBRs for low C/N ratio and antibiotic wastewater treatment[J]. [Bioresource Technology](#), 2018, 256: 557-561.
- [41] VAN N L, JETTEN M S M. Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: Unique microorganisms with exceptional properties[J]. [Microbiology and Molecular Biology Reviews](#), 2012, 76(3): 585-596.
- [42] WANG Q, HE J. Complete nitrogen removal via simultaneous nitrification and denitrification by a novel phosphate accumulating *Thauera* sp. strain SND5[J]. [Water Research](#), 2020, 185: 116300.
- [43] 毛跃建. 废水处理系统中重要功能类群 *Thauera* 属种群结构与功能的研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2009.
- [44] CHEN H J, ZHOU W Z, ZHU S N, et al. Biological nitrogen and phosphorus removal by a phosphorus-accumulating bacteria *Acinetobacter* sp. strain C-13 with the ability of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification[J]. [Bioresource Technology](#), 2020, 322: 124507.
- [45] LIU S, LI J. Accumulation and isolation of simultaneous denitrifying polyphosphate-accumulating organisms in an improved sequencing batch reactor system at low temperature[J]. [International Biodeterioration & Biodegradation](#), 2015, 100: 140-148.
- [46] 杨垒, 陈宁, 任勇翔, 等. 异养硝化细菌 *Acinetobacter junii* NP1 的同步脱氮除磷特性及动力学分析[J]. [环境科学](#), 2019, 40(8): 3713-3721.
- [47] WAN W, HE D, XUE Z. Removal of nitrogen and phosphorus by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a denitrifying phosphorus-accumulating bacterium *Enterobacter cloacae* HW-15[J]. [Ecological Engineering](#), 2017, 99: 199-208.
- [48] 余俊霞, 陈双荣, 刘凌言, 等. 复合人工湿地系统对低污染水总氮的净化效果及其微生物群落结构特征[J/OL]. [环境工程](#): 1-11[2021-10-03]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2097.X.20210617.1622.018.html>.
- [49] 李维, 石先阳. 氧化锌纳米颗粒对SBR中活性污泥脱氮性能及硝化细菌丰度的影响[J]. [环境工程学报](#), 2017, 11(8): 4549-4558.
- [50] 王涛, 张栋, 戴翎翎, 等. 纳米材料对污水/污泥厌氧消化系统影响的研究进展[J]. [环境工程](#), 2015, 33(6): 1-5.
- [51] 魏佳明, 崔丽娟, 李伟, 等. 表流湿地细菌群落结构特征[J]. [环境科学](#), 2016, 37(11): 4357-4365.

(责任编辑: 曲娜)

## Size-dependent effects of ZnO nanoparticles on operational performance of constructed wetlands

WANG Wenyue<sup>1</sup>, HU Tiantian<sup>2</sup>, YU Lihua<sup>3</sup>, MA Chunyun<sup>1</sup>, KONG Fanlong<sup>1</sup>, WANG Sen<sup>1,\*</sup>

1. School of Environmental Science and Engineering, Qingdao University, Qingdao 266071, China

2. Ningbo Jianyi Testing Technology Co. Ltd., Ningbo 315303, China

3. Laixi Branch of Qingdao Municipal Bureau of Ecology and Environment, Qingdao 266600, China

\*Corresponding author, E-mail: wangsen@qdu.edu.cn

**Abstract** ZnO nanoparticles (ZnO NPs) have catalytic activity, strong oxidability and high stability, which are widely used in semiconductors, dyes, plastic additives, cosmetics and many other fields. The life cycle of the ZnO NPs series of products, will inevitably cause damage to the environment, thus affect the sewage disposal system. laboratory scale horizontal subsurface flow constructed wetlands were operated for 126 days when influent chemical oxygen demand (COD), total nitrogen (TN) and total phosphorus (TP) were about 216.00 mg·L<sup>-1</sup>, 11.10 mg·L<sup>-1</sup> and 3.84 mg·L<sup>-1</sup>, respectively. To investigate the size-dependent effects of ZnO NPs on the operational performance of constructed wetlands, the nitrogen, and phosphorus removal performance, the permeability coefficient of fillers, the content and characteristics of extracellular polymeric substances (EPS), as well as the change in microbial community structure and diversity after exposure to different particle sizes of ZnO NPs (10.00 mg·L<sup>-1</sup>) were studied. The results indicated that compared with the control group, the removal efficiencies of COD in the constructed wetlands exposed to 15 nm, 50 nm, and 90 nm of ZnO NPs decreased by 8.73%, 7.55%, and 6.97%, respectively, meanwhile the removal efficiencies of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N and TN decreased by 21.96% and 10.95%, 17.75% and 10.00%, and 15.34%, and 3.78%, respectively. High throughput sequencing indicated that the smaller ZnO NPs size, the more significant inhibitory effect on nitrification bacterium (e.g. *Thauera*). After adding ZnO NPs, the released Zn<sup>2+</sup> could combine with phosphate in water to form insoluble substances such as zinc phosphate precipitation, and the relative abundance of the heterotrophic nitrifying bacterium (e.g. *Acinetobacter*) also increased, which resulted in the increase of TP removal efficiencies by 42.49%~56.38% in comparison with the control group. In addition, compared with the control group (97.18 mg·g<sup>-1</sup>), the EPS contents when exposing to 15 nm, 50 nm, and 90 nm of ZnO NPs increased to 212.97 mg·g<sup>-1</sup>, 156.30 mg·g<sup>-1</sup>, and 128.53 mg·g<sup>-1</sup>, respectively. The increasing EPS contents led to a rapid decrease of the permeability coefficient of fillers by 71.17%, 67.83%, and 37.50% at 83 days, respectively.

**Keywords** ZnO nanoparticles; size-dependent effect; constructed wetlands; clogging; microbial community