



厦门大学学报(自然科学版)

Journal of Xiamen University(Natural Science)

ISSN 0438-0479,CN 35-1070/N

《厦门大学学报(自然科学版)》网络首发论文

题目: 功能化石墨烯对海洋环境细菌群落结构及生长的影响
作者: 张作峰, 曾令宇, 王兆守, 邵宗泽
收稿日期: 2019-04-14
网络首发日期: 2019-07-10
引用格式: 张作峰, 曾令宇, 王兆守, 邵宗泽. 功能化石墨烯对海洋环境细菌群落结构及生长的影响. 厦门大学学报(自然科学版).
<http://kns.cnki.net/kcms/detail/35.1070.n.20190708.1453.002.html>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

功能化石墨烯对海洋环境细菌群落结构及生长的影响

张作峰^{1,2}, 曾令宇², 王兆守^{1,2}, 邵宗泽²

(1. 厦门大学化学化工学院, 福建 厦门 361005; 2. 自然资源部第三海洋研究所, 自然资源部海洋生物遗传资源重点实验室, 福建 厦门 361005)

通信作者 wzs@xmu.edu.cn (王兆守); shaozz@163.com (邵宗泽)

摘要 功能化石墨烯因其优异的导电、传热和机械性能, 应用前景广阔。为了解功能化石墨烯对海洋环境可能的生态毒性效应, 将功能化石墨烯分别加入近岸海水(终质量浓度 50 mg/L)和沉积物(终质量分数 50 mg/kg)中, 通过模拟海洋环境对样品培养 2 周, 并采用 DNA 高通量测序技术分析功能化石墨烯对海洋细菌群落结构的影响。结果表明功能化石墨烯对两种海洋环境来源的细菌物种组成均有明显影响, 但影响效果不同: 暴露于功能化石墨烯后, 海水中细菌的物种多样性和丰度降低, 而沉积物中细菌的物种多样性和丰度升高, 这可能是功能化石墨烯在海水和海洋沉积物中分散、吸附和团聚等环境行为存在差异所致。然而, 无论在哪种环境来源的处理组中, 功能化石墨烯的存在均对光合细菌的生长起促进作用。上述结果可为功能化石墨烯的海洋生态安全性评估提供参考。

关键词 功能化石墨烯; 海洋细菌; 群落结构; 多样性分析

中图分类号 Q 938.1

文献标志码 A

DOI: 10.6043/j.issn.0438-0479.201904012

Effects of functionalized graphene on bacterial community structure and growth in marine environments

ZHANG Zuofeng^{1,2}, ZENG Lingyu², WANG Zhaoshou^{1,2},

SHAO Zongze²

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Key Laboratory of Marine Biological Genetic Resources, Ministry of Natural Resources, The Third Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources of China, Xiamen 361005, China)

Abstract Functionalized graphene has broad application prospects due to its excellent electrical conductivity, heat transfer and mechanical properties. In order to understand the possible ecotoxic effects of functionalized graphene on the marine environment, we added functionalized graphene to the coastal waters (50 mg/L) and sediments (50 mg/kg) respectively, and cultured the samples for 2 weeks by simulating the marine environment. The effect of functionalized graphene on the structure of marine bacterial community was analyzed by high-throughput DNA sequencing technology. The results show that functionalized graphene has significant effects on the species composition of bacteria from two marine environments, and the effects are different; upon exposure to functionalized graphene, species diversity and abundance of bacteria in seawater are reduced, while species diversity and abundance of bacteria in sediments are increased. This may be due to differences in environmental behaviors such as disperse, adsorption and agglomeration of functionalized graphene in seawater and marine sediments. However, functionalized graphene promoted photosynthetic bacteria in both seawater and marine sediments. This study provides a reference for the assessment of marine ecological safety of functionalized graphene.

Key words functionalized graphene; marine bacteria; community structure; diversity analysis

石墨烯是由 sp² 杂化碳原子组成的二维蜂窝状晶体, 只有一层原子, 是世界上已知的最薄、最坚硬的材料^[1]。石墨烯凭借其优异的机械、导电和传热性能, 在化学、物理、生物医学和材料科学等领

基金项目: 厦门市海洋经济创新发展示范项目(16PZP001SF16); 国家微生物资源平台项目(NIMR-2019-9); 国家海洋局海洋生物遗传资源重点实验室开放研究基金(HY201505)

网络首发时间: 2019-07-10 09:38:24 网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/35.1070.n.20190708.1453.002.html>

域掀起了研究热潮。目前,石墨烯的生态毒性效应已经引起了人们的广泛关注^[2]。Perreault 等^[3]将大肠杆菌暴露于不同尺寸的石墨烯中,发现石墨烯的抗菌性随着尺寸减小而增大,推断这主要是因为小片径石墨烯具有更明显的表面缺陷,而这些表面缺陷是其抗菌机制的关键。Ren 等^[4]基于实时定量聚合酶链反应(q-PCR)和焦磷酸测序评估了石墨烯对土壤中细菌的群落结构、丰度和功能的影响,发现石墨烯可在短期内促进土壤中酶的活性和菌体生物量,且参与氮循环和有机物降解的一些细菌群体受石墨烯影响较大。

纯石墨烯纳米片之间存在很强的分子间作用力,在水相中极易形成团聚体。为充分发挥石墨烯各项优异的性能,提高其在水相中的分散性和可塑性,人们通常会选择对石墨烯进行表面功能化^[5]。功能化石墨烯在生物医药、航空航天和储能材料等诸多领域拥有广阔的应用前景。未来随着大规模应用,功能化石墨烯将不可避免地在生态环境中富集,而其汇集地之一便可能是海洋环境。功能化石墨烯在海洋生态环境中的稳定性主要取决于自身结构与所处环境的理化性质。在水环境中,石墨烯基材料可表现出分散效应、团聚效应和吸附效应,而这主要受其所处环境的光照强度、离子浓度、离子种类和 pH 值等因素影响^[6]。石墨烯基材料自身的一些性质,如浓度、层数和表面结构缺陷等也是影响其在水环境中的分散性和稳定性的因素^[7, 8]。上述因素的综合作用决定了石墨烯基材料的环境行为。同时,功能化石墨烯在水环境中几乎不能降解,因此,即使目前功能化石墨烯暴露于海洋环境后浓度可能较低,但也应该引起人们足够的关注^[9]。

海洋是地球上最大的生态系统,拥有着极为丰富的矿产资源、水产资源和微生物资源。海洋生态系统中的微生物既有分解者,也有生产者,它们对海洋生态系统的良性循环发挥着重要的作用^[10]。然而,当石墨烯类纳米材料暴露于海洋环境后,其对海洋微生物群落结构的影响尚未知。本研究在实验室条件下模拟海洋生态环境,并采用 DNA 高通量测序技术分析海水和海洋沉积物中细菌群落结构对功能化石墨烯的响应,以为功能化石墨烯的海洋生态毒性效应做出早期预警。

1 材料与方法

1.1 功能化石墨烯的制备与表征

取 0.253 g 氧化石墨烯放入装有蒸馏水的烧杯(50 mL)中,将烧杯放入超声振荡器中超声处理 5 min。然后快速加入聚乙二醇(PEG, 25.019 g),在 25 °C 下 300 r/min 摇床中搅拌 24 h,得到粗功能化石墨烯。最后将其用乙醇冲洗 7 次,以洗去未反应的 PEG,放入真空干燥室 80 °C 干燥 4 h,则制备得到纯功能化石墨烯^[11]。

称取适量功能化石墨烯固体粉末并加入一定量的去离子水,经高温灭菌和超声后配置得 1 mg/L 的母液。吸取适量滴加到干净的硅片上,烘干后分别通过 Quanta 450 环境扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)和 JEM-1230 透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)进行表征。

在 514.5 nm 波长条件下,通过 RM-1000 拉曼光谱仪检测了功能化石墨烯和氧化石墨烯的拉曼光谱,其峰值位置分辨率小于 1 cm⁻¹。光谱测定范围为 800 ~ 2000 cm⁻¹。

设置 Refractive index 为 1.333, absorption 为 0.01,通过 Zetasizer Nano-ZS90 纳米粒度及电位分析仪检测氧化石墨烯和功能化石墨烯的 zeta 电位。纳米材料在体系中的分散性越好,其 zeta 电位绝对值越大。

1.2 海水样品的处理及其 DNA 的提取

分别在白城(北纬 24°26', 东经 118°05')、杏林湾(北纬 24°35', 东经 118°03')和五缘湾(北纬 24°32', 东经 118°10')三地取海水样品混合并装入锥形瓶中(每瓶 1 L)。对照组的海水样品在光照强度为 1200 lux 条件下震荡(转速为 60 r/min)培养,不添加功能化石墨烯;处理组添加适量经超声处理的功能化石墨烯,使其浓度达到 50 mg/L,其他条件与对照组相同。2 周后,将海水样品逐一抽滤(使用 0.22 μm 抽滤膜),并通过土壤 DNA 提取试剂盒(POWERSOIL DNA Isolation Kit)提取

海水样品的 DNA。通过 NanoDrop2000 超微量分光光度计 (Thermo Fisher Scientific Inc) 检测核酸浓度, 保证样品 DNA 浓度超过 50 ng/ μ L。最后, 将海水样品的 DNA 送往上海美吉生物医药科技有限公司进行高通量测序 (引物名称为 338F_806R, 338F 序列为 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3', 806R 序列为 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3', 下同)。每组样品均设有 3 个生物学重复。

1.3 海洋沉积物样品的处理及其 DNA 的提取

分别在白城 (北纬 24°26', 东经 118°05')、杏林湾 (北纬 24°35', 东经 118°03') 和五缘湾 (北纬 24°32', 东经 118°10') 三地取海洋沉积物样品混合并装入培养箱中 (每箱 5 kg)。对照组沉积物样品在光照强度为 1200 lux 条件下培养, 每天搅拌 6 次 (上、下午各 3 次), 处理组添加适量经超声处理的功能化石墨烯, 使其浓度达到 50 mg/kg, 其他条件与对照组相同。2 周后, 从培养箱中随机取 0.75 g 混合均匀的海洋沉积物样品, 通过土壤 DNA 提取试剂盒 (POWERSOIL DNA Isolation Kit) 提取海洋沉积物样品的 DNA。通过 NanoDrop2000 超微量分光光度计 (Thermo Fisher Scientific Inc) 检测核酸浓度, 保证样品 DNA 浓度超过 50 ng/ μ L。最后, 将海洋沉积物样品的 DNA 送往上海美吉生物医药科技有限公司进行高通量测序。每组样品均设有 3 个生物学重复。

1.4 Alpha 多样性分析

Alpha 多样性分析包括 Sobs 指数、Chao 指数、Ace 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数等度量标准, 能够衡量单个样品中的多样性水平, 其中, 前 4 个指数越大, Simpson 指数越小, 表示样品中物种越丰富^[12]。Coverage 指数代表样品文库的覆盖率, 该指数越高, 则样本中序列未被测出的概率就越低^[13]。Coverage 指数可反映测序结果能否代表样本的真实状况。

1.5 稀释曲线分析

稀释曲线 (Rarefaction curve) 是从样本中随机抽取序列 (reads), 统计这些序列所代表的操作分类单元 (Operational Taxonomic Units, OTU), 并以抽取的序列数目为横坐标, 相应的 OTU 数目为纵坐标, 绘制曲线。当曲线趋向平坦时, 说明测序数据量合理, 更多的数据量只会产生少量新的物种, 反之则表明继续测序还可能产生较多新的物种^[12]。对于不同的样本来说, 位于上方的样本的物种丰富度要高于位于下方的样本。

1.6 功能化石墨烯对海水及沉积物中细菌细胞浓度的影响

采用菌落计数法 (plate colony counting method)^[14]检测经功能化石墨烯处理后样品中细菌的细胞浓度, 并计算存活率。

海水样品: 取培养 2 周后的海水样品 1 mL 并将其稀释 10⁵ 倍, 取 100 μ L 稀释后的样品均匀地涂布在 2216E 平板 (Oxoid Limited 公司) 上; 在 37 °C 下连续培养 48 h 后, 计数菌落并与对照板上的菌落进行比较。沉积物样品: 取培养 2 周后的沉积物样品 10 g 加入到装有 90 mL 去离子水的锥形瓶中; 将该悬浊液充分摇匀后, 取 1 mL 悬浊液并将其稀释 10⁵ 倍, 取 100 μ L 稀释后的样品均匀地涂布在 2216E 平板上; 在 37 °C 下连续培养 48 h 后, 计数菌落并与对照板上的菌落进行比较。

设定存活率计算公式: $S = A_t/A_c \times 100\%$, 其中 A_t 和 A_c 分别表示处理组和对照组的平板计数。每组样品均设有 3 个生物学重复。

1.7 细菌物种组成分析

在“门”和“属”的分类水平上对海洋细菌的物种组成进行统计分析, 并通过图表的形式直观地展现群落组成, 重点研究海水和海洋沉积物中细菌的物种及相对丰度在功能化石墨烯影响下的演替规律^[15]。

2 结果与分析

2.1 功能化石墨烯的表征

图 1(a)和图 1(b)分别为功能化石墨烯 SEM 和 TEM 的形貌表征结果, 可以看出: 功能化石墨烯整

体呈片层结构, 粒径为 3~5 μm , 表面有很多不规则凸起和褶皱, 且边缘处极其尖锐。图 1(c)为氧化石墨烯 (GO) 和功能化石墨烯 (FG) 拉曼光谱表征结果。氧化石墨烯的 G 峰和 D 峰分别出现在 1597 cm^{-1} 和 1345 cm^{-1} , 而功能化石墨烯的 G 峰和 D 峰分别出现在 1588 cm^{-1} 和 1341 cm^{-1} 。由于氧化石墨烯表面分布着大量孤立的 C=C 双键, 其 G 峰呈现向更高强度的位置转移, 而这通常定义为蓝移^[16]。图 1(d)为氧化石墨烯 (GO) 和功能化石墨烯 (FG) 的 zeta 电位表征结果。氧化石墨烯的 zeta 电位是 -31.87 mV , 而功能化石墨烯的 zeta 电位是 -38.30 mV 。这说明功能化石墨烯拥有更加良好的分散性。

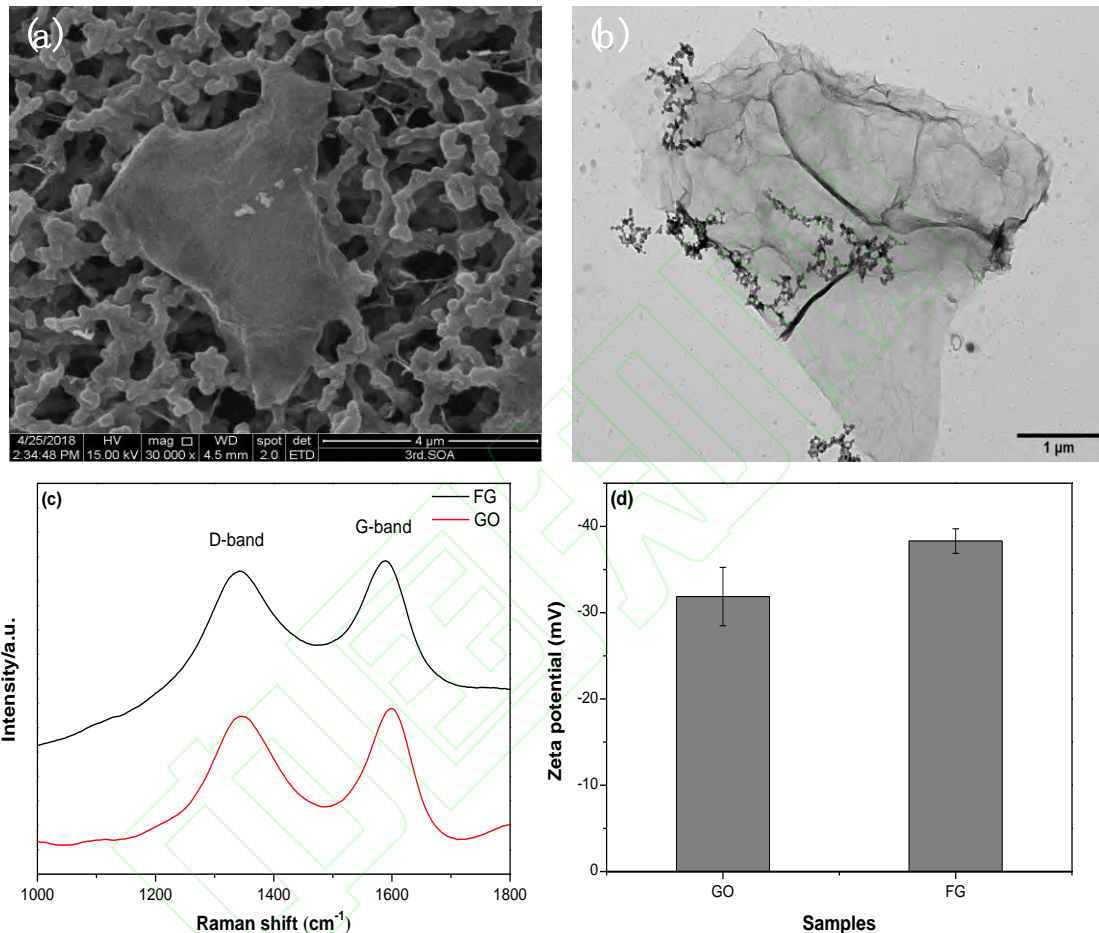


图 1 分别基于 SEM (a), TEM (b), 拉曼光谱 (c) 及 zeta 电位 (d) 对功能化石墨烯的表征
Fig. 1 Characterization of functionalized graphene based on SEM (a), TEM (b), Raman spectroscopy (c) and zeta potential (d)

2.2 功能化石墨烯对海洋细菌多样性和物种丰度的影响

海水中细菌 Alpha 多样性指数分析和稀释曲线分析结果如表 1 和图 2(a)所示: 对照组和处理组中 Coverage 指数分别为 0.999492 和 0.999276, 均超过 99.9%; 处理组的 Sobs 指数、Chao 指数、Ace 指数和 Shannon 指数较对照组有所降低, 而 Simpson 指数较对照组有所升高; 对高通量序列进行随机抽样所得到的稀释曲线趋于饱和, 且对照组的 OTU 数目高于处理组。上述结果表明功能化石墨烯能够降低海水中细菌的物种丰度和多样性。

海洋沉积物中细菌 Alpha 多样性指数分析和稀释曲线分析结果如表 1 和图 2 (b)所示: 对照组和处理组中 Coverage 指数分别为 0.99899 和 0.999389, 均超过 99.8%; 处理组的 Sobs 指数、Chao 指数、Ace 指数和 Shannon 指数较对照组有所上升, 而 Simpson 指数较对照组有所下降; 对高通量序列进行随机抽样所得到的稀释曲线趋于平坦, 且处理组的 OTU 数目高于对照组。上述结果表明功能化石墨

烯能够提高海洋沉积物中细菌的物种丰度和多样性。

表1功能化石墨烯对海洋细菌Alpha多样性的影响

Tab. 1 Effects of functionalized graphene on Alpha diversity index of marine bacteria

样品	Sobs 指数	Chao 指数	Ace 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	Coverage 指数
CW	694	702.5526	702.50703	4.999356	0.027251	0.999492
TW	654	683.5625	671.07507	4.794667	0.029821	0.999276
CS	651	675.0222	670.1749	4.7684	0.02358	0.99899
TS	705	715.9688	714.7377	5.3588	0.01025	0.999389

注：CW、TW、CS 和 TS 分别代表对照组海水样品、处理组海水样品、对照组沉积物样品和处理组沉积物样品（下同）。

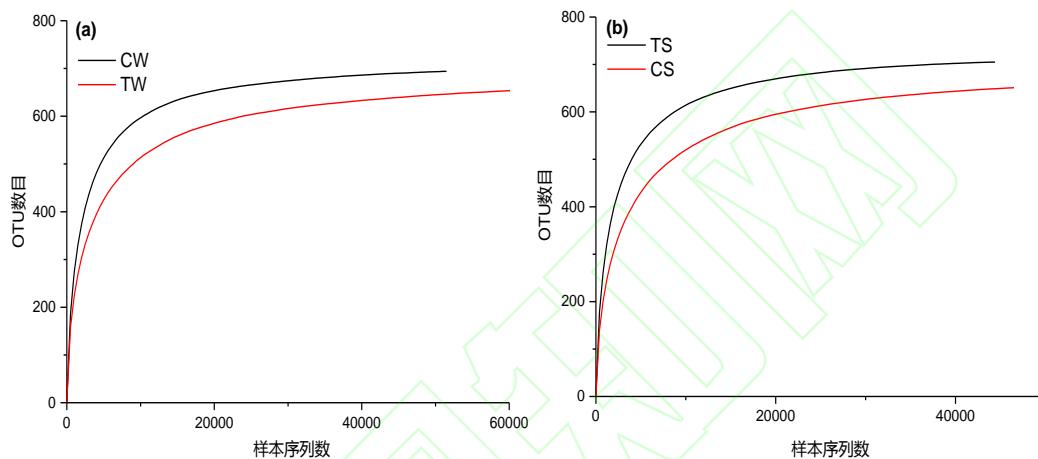


图 2 基于 16S rRNA 基因高通量测序的海水 (a) 和海洋沉积物 (b) 细菌稀释曲线分析

Fig. 2 Analysis of bacterial rarefaction curves of seawater (a) and marine sediments (b) based on 16S rRNA gene high-throughput sequencing

2.3 功能化石墨烯对海水及沉积物中细菌细胞浓度的影响

在 37 °C 下连续培养 48 h 后，对各样品中的微生物菌落进行计数，结果如图 3 所示：对照组海水样品中细菌的细胞浓度为 4.27×10^7 cfu/mL，而处理组海水样品中细菌的细胞浓度为 3.25×10^7 cfu/mL，海水样品经功能化石墨烯处理后细菌的存活率为 76.1%；对照组沉积物样品中细菌的细胞浓度为 1.56×10^8 cfu/mL，而处理组沉积物样品中细菌的细胞浓度高达 1.90×10^8 cfu/mL，沉积物样品中细菌经功能化石墨烯处理后的存活率为 122%。可见，功能化石墨烯对海水中细菌的生长具有一定的抑制作用，而对海洋沉积物中细菌的生长具有一定的促进作用。

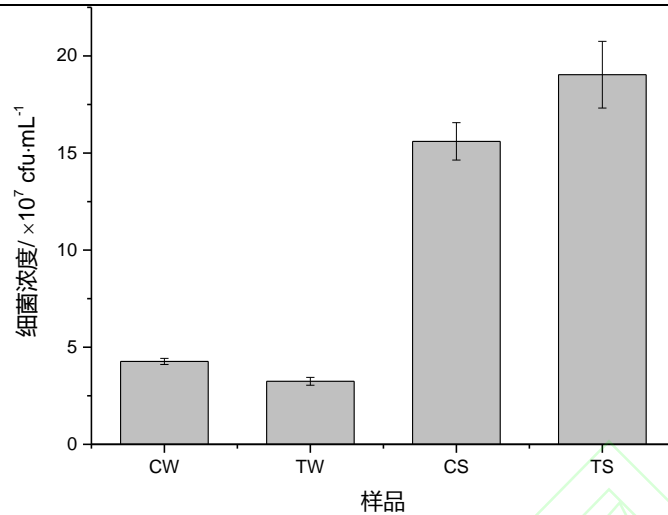


图3 功能化石墨烯对海水和海洋沉积物样品中细菌细胞浓度的影响
Fig. 3 Effect of functionalized graphene on concentration of bacterial cells in seawater and marine sediment

2.4 功能化石墨烯对海水及沉积物中细菌物种组成的影响

在“门”水平上对海水中细菌物种组成分析的结果如表2所示。总体上,海水样品中共有25个门的细菌被检测出来,且对照组和处理组的菌群多样性存在差异。对照组海水样品中的优势菌群为变形菌门(Proteobacteria),其相对丰度超过70%,其次为拟杆菌门(Bacteroidetes)、蓝细菌门(Cyanobacteria)等;处理组海水样品中的优势菌群依然为变形菌门(Proteobacteria),但其相对丰度下降至58.39%,且蓝细菌门(Cyanobacteria)和疣微菌门(Verrucomicrobia)的相对丰度较对照组明显提高,分别位列第二和第五位;在对照组中,衣原体门(Chlamydiae)和螺旋体门(Spirochaetae)被检测出,但这2个门在处理组未被检测出来;纤维杆菌门(Fibrobacteres)在对照组中未被检测到,但存在于处理组中。

在“门”水平上对海洋沉积物中细菌物种组成分析的结果如表2所示。总体来看,海洋沉积物样品中共有22个门的细菌被检测出来,且对照组和处理组的菌群多样性存在差异。对照组沉积物样品中相对丰度排前两位的是变形菌门(Proteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes),两者占比超90%;处理组沉积物样品中相对丰度排前两位的依然为变形菌门(Proteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes),但两者相对丰度均有所下降,且蓝细菌门(Cyanobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)和放线菌门(Actinobacteria)的相对丰度较对照组均大幅提高;Gracilibacteria和Saccharibacteria在对照组中检测出,但却并未在处理组中被检测出来。

表2 门水平上的海水及海洋沉积物中细菌的物种组成分析

Tab. 2 Analysis of species composition of bacteria in seawater and marine sediments on phylum level

样品	门	相对丰度/%
CW	变形菌门 (Proteobacteria)	70.7
	拟杆菌门 (Bacteroidetes)	9.64
	蓝细菌门 (Cyanobacteria)	7.21
	浮霉菌门 (Planctomycetes)	5.15
	放线菌门 (Actinobacteria)	3.25
	其他 (Others)	4.05
	变形菌门 (Proteobacteria)	58.39
TW	蓝细菌门 (Cyanobacteria)	21.78
	拟杆菌门 (Bacteroidetes)	8.72
	浮霉菌门 (Planctomycetes)	5.39
	疣微菌 (Verrucomicrobia)	3.54
	其他 (Others)	2.18
	变形菌门 (Proteobacteria)	69.88
	拟杆菌门 (Bacteroidetes)	25.14
CS	放线菌门 (Actinobacteria)	2.29
	蓝细菌门 (Cyanobacteria)	0.89
	疣微菌 (Verrucomicrobia)	0.68
	其他 (Others)	1.12
	变形菌门 (Proteobacteria)	62.27
TS	拟杆菌门 (Bacteroidetes)	11.61
	蓝细菌门 (Cyanobacteria)	11.39
	浮霉菌门 (Planctomycetes)	5.25
	放线菌门 (Actinobacteria)	3.43
	其他 (Others)	6.05

在“属”水平上对海水细菌物种组成分析的结果如表 3 所示。分析显示，海水样品中共有 285 个属的细菌被检测出来，且对照组和处理组的菌群多样性存在差异。经过 2 周模拟海洋环境培养后，处理组中 *norank_c_Cyanobacteria*, *Unclassified_f_Haliaceae* 和 *Unclassified_f_Rhodobacteraceae* 的相对丰度较对照组大幅提高；*norank_f_Piscirickettsiaceae* 在对照组中的相对丰度为 14.18%，而其处理组中的相对丰度仅为 0.60%；除上述 4 个属外，对照组和处理组的其它菌属相对丰度的差异较小。

在“属”水平上对海洋沉积物来源细菌物种组成分析的结果如表 3 所示。总体来看，海洋沉积物来源样品中共有 316 个属的细菌被检测出来，且对照组和处理组的菌群多样性存在差异。我们发现，经过 2 周模拟海洋环境培养后，*norank_c_Cyanobacteria* 在对照组中的相对丰度仅为 0.88%，而其在处理组的相对丰度则大幅升高至 11.34%；处理组中 *Lentibacter*, *Planktomarina*, *norank_f_Cryomorphaceae* 和 *Pseudoalteromonas* 的相对丰度分别较对照组大幅降低；除上述 5 个属外，对照组和处理组的其它菌属相对丰度的差异较小。

表3 属水平上的海水及海洋沉积物中细菌的物种组成分析
 Tab. 3 Analysis of species composition of bacteria in seawater and marine sediments on genus level

样品	属	相对丰度/%
CW	<i>norank_f_Piscirickettsiaceae</i>	14.18
	<i>norank_c_Cyanobacteria</i>	7.13
	<i>norank_c_OM190</i>	4.31
	<i>OM43_clade</i>	3.81
	<i>Spongiibacter</i>	3.76
	其他 (Others)	66.81
TW	<i>norank_c_Cyanobacteria</i>	21.65
	<i>Unclassified_f_Haliaceae</i>	4.86
	<i>Unclassified_f_Rhodobacteraceae</i>	4.31
	<i>norank_c_OM190</i>	4.27
	<i>Spongiibacter</i>	3.81
	其他 (Others)	61.10
CS	<i>Lentibacter</i>	9.60
	<i>Planktomarina</i>	7.31
	<i>Pseudoalteromonas</i>	4.55
	<i>norank_f_Cryomorphaceae</i>	4.34
	<i>NS3a_marine_group</i>	3.80
	其他 (Others)	70.40
TS	<i>norank_c_Cyanobacteria</i>	11.34
	<i>norank_c_OM190</i>	4.27
	<i>Asciaceihabitans</i>	3.77
	<i>norank_f_Piscirickettsiaceae</i>	3.768
	<i>OM43_clade</i>	3.13
	其他 (Others)	73.72

3 讨论

本研究通过实验室模拟功能化石墨烯污染海洋环境,分析了海水和海洋沉积物中细菌群落对功能化石墨烯的响应,以及功能化石墨烯对海水和沉积物中细菌生长的影响。结果显示:暴露于的功能化石墨烯后,海水与沉积物中细菌群落结构有不同变化。但是,无论在哪种环境来源的处理组中,功能化石墨烯的存在均对光合细菌的生长起促进作用。前期实验中,我们通过检测不同浓度功能化石墨烯(0~50 mg/L)对海杆菌(*Marinobacter* sp.)、盐单胞菌(*Halomonas* sp.)、交替单胞菌(*Alteromonas* sp.)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)、聚球藻(*Synechococcus* sp.)和红酵母(*Rhodotorula* sp.)等海洋微生物生长的影响,发现50 mg/L功能化石墨烯对上述海洋微生物的抑菌性能最强,生长抑制率为20%~50%(未发表)。本研究中,海水处理组和沉积物处理组的终浓度分别为50 mg/L和50 mg/kg。考虑到沉积物密度高于海水,虽然质量浓度接近,沉积物中功能化石墨烯的实际浓度应该高于海水。

Alpha多样性分析和稀释曲线分析结果显示,经功能化石墨烯处理后,海水中细菌的多样性和物种丰度下降,而海洋沉积物中细菌的多样性和物种丰度上升。同时,菌落计数结果显示,功能化石墨烯能够从整体上抑制海水中细菌的生长,促进沉积物中细菌的生长。Zou等^[17]提出,石墨烯能够通过微生物表面直接接触并对其造成不可逆的机械损伤而抑制微生物正常的生长和代谢活动。Farid等^[18]通过激光诱导击穿光谱,测定经石墨烯处理后大肠杆菌和金黄色葡萄球菌细胞膜的完整性,发现石墨烯主要通过直接破坏细菌的细胞膜而造成菌体损伤。我们推测,在海水中功能化石墨烯分散性好,能够与细菌直接接触,容易对其造成机械损伤,从而使得海水样品中细菌的多样性、物种丰度和细胞浓度下降。而在沉积物样品中,功能化石墨烯可能与沉积物中的大量颗粒物相互作用,从而减弱细胞毒性;此外,功能化石墨烯可能通过吸附沉积物中的大量颗粒有机物,为细菌的生长与生物膜的形成提供适宜“载体”,从而使得海洋沉积物样品中细菌的多样性、物种丰度和细胞浓度提高,而具体机制还有待深入研究。前人研究报道,由于石墨烯比表面积较大,且拥有良好的共轭结构,能够吸附有机物,从而可为微生物生长提供营养丰富的附着基底^[19,20]。

在功能化石墨烯处理的海水样品中,门水平上Cyanobacteria和Verrucomicrobia的相对丰度提

高, Proteobacteria 和 Bacteroidetes 的相对丰度降低; 属水平上主要变化的类群属于以上门类中的未培养类群, 其中 norank_c_Cyanobacteria, Unclassified_f_Haliaceae 和 Unclassified_f_Rhodobacteraceae 的相对丰度提高, 而 norank_f_Piscirickettsiaceae 的相对丰度降低。在海洋沉积物样品中, 功能化石墨烯提高了门水平上 Cyanobacteria 和 Planctomycetes 的相对丰度, 降低了门水平上 Proteobacteria 和 Bacteroidetes 的相对丰度; 在属水平上, norank_c_Cyanobacteria 的相对丰度得以提高, 而 *Lentibacter*, *Planctomarina*, norank_f_Cryomorphaceae 和 *Pseudoalteromonas* 的相对丰度降低。由以上分析可见, 无论海水样品还是沉积物样品, 添加功能化石墨烯后, 光合细菌 norank_c_Cyanobacteria 的相对丰度都有所上升, 其影响机制有待进一步研究。本课题组前期研究表明低浓度 (0.1 mg/L) 的纳米二氧化钛可以促进光合细菌聚球藻 (*Synechococcus* sp.) 生长^[21]。我们推测不论是功能化石墨烯还是纳米二氧化钛, 其优异的光学和电学性能可能是促进光合细菌生长的关键。

综上, 本研究通过分析海洋细菌群落结构在功能化石墨烯影响下的演替, 发现海水和沉积物中细菌对功能化石墨烯的响应存在差异。功能化石墨烯 (50 mg/L) 降低了海水中细菌的多样性和生物量; 功能化石墨烯 (50 mg/kg) 提高了沉积物中细菌的多样性和生物量。同时, 不同的海洋细菌对功能化石墨烯的响应亦有所不同。这些结果为进一步评估石墨烯基材料的海洋生态安全性提供了一定参考。

参考文献:

- [1] ZHANG S, SHAO Y Y, LIAO H G, et al. Polyelectrolyte-induced reduction of exfoliated graphite oxide: a facile route to synthesis of soluble graphene nanosheets[J]. *Acs Nano*, 2011, 5(3): 1785-1791.
- [2] SHAREENA T P D, MCSHAN D, DASMAHAPATRA A K, et al. A review on graphene-based nanomaterials in biomedical applications and risks in environment and health[J]. *Nano-Micro Letters*, 2018, 10(3): 53.
- [3] PERREAULT F, FARIA A F D, NEJATI, S, et al. Antimicrobial properties of graphene oxide nanosheets: why size matters[J]. *Acs Nano*, 2015, 9(7): 7226-7236.
- [4] REN W J, REN G D, TENG Y, et al. Time-dependent effect of graphene on the structure, abundance, and function of the soil bacterial community[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, 297: 286-294.
- [5] CAI D, SONG M. Recent advance in functionalized graphene/polymer nanocomposites[J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2010, 20(37): 7906-7915.
- [6] 吕小慧, 陈白杨, 朱小山. 氧化石墨烯的水环境行为及其生物毒性[J]. *中国环境科学*, 2016, 36(11): 3348-3359.
- [7] SU Y, YANG G Q, LU K, et al. Colloidal properties and stability of aqueous suspensions of few-layer graphene: Importance of graphene concentration[J]. *Environmental Pollution*, 2017, 220(1): 469-477.
- [8] YANG K J, CHEN B L, ZHU X Y, et al. Aggregation, adsorption and morphological transformation of graphene oxide in aqueous solutions containing different metal cations[J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(20): 11066-11075.
- [9] PRETTI C, OLIVA M, PIETRO R D, et al. Ecotoxicity of pristine graphene to marine organisms [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2014, 101(1): 138-145.
- [10] ZHANG S, ZHANG C S, TIAN X P, et al. The study of diversities of marine microbes in China[J]. *Bulletin of the Chinese Academy of Sciences*, 2010, 24(4): 228-234.
- [11] LIU Z, ROBINSON J T, SUN X M, et al. PEGylated nanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(33): 10876-10877.
- [12] 付新华, 刘国宁, 何健龙, 等. 山东省渤海海洋保护区典型海域表层海水微生物群落多样性分析 [J]. *海洋科学*, 2017, 41(1): 39-47.
- [13] 孙向楠, 胡晓珂, 王慧. 海洋沉积物细菌群落结构对苊和苯甲酸钠胁迫的响应 [J]. *海洋与湖沼*, 2015, 46(6): 1304-1311.
- [14] GURUNATHAN S, HAN J W, DAYEM A A, et al. Oxidative stress-mediated antibacterial activity of graphene oxide and reduced graphene oxide in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2012, 7: 5901-5914.
- [15] BEAZLEY M J, MARTINEZ R J, RAJAN S, et al. Microbial community analysis of a coastal salt marsh affected by the deepwater horizon oil spill [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): 398-411.
- [16] KUDIN K N, OZBAS B, SCHNIEPP H C, et al. Raman spectra of graphite oxide and functionalized graphene sheets [J]. *Nano Letters*, 2008, 8(1): 36-41.
- [17] ZOU X F, ZHANG L, WANG Z J, et al. Mechanisms of the antimicrobial activities of graphene materials[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138(7): 2064-2077.
- [18] FARID M U, JEONG S, SEO D H, et al. Mechanistic insight into the in vitro toxicity of graphene oxide against biofilm forming bacteria using laser-induced breakdown spectroscopy[J]. *Nanoscale*, 2018, 10(9): 4475-4487.
- [19] WALLACE G G, MULLER M B, LI D, et al. Mechanically strong, electrically conductive, and biocompatible graphene paper[J]. *Advanced Materials*, 2010, 20(18): 3557-3561.
- [20] RUIZ O N, FERNANDO K A S, WANG B J, et al. Graphene oxide: a nonspecific enhancer of cellular growth[J]. *Acs Nano*, 2011, 5(10): 8100-8107.
- [21] 陈嘉祥, 王兆守, 邵宗泽. 常见海洋细菌对纳米二氧化钛的响应[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2018, 57(3): 329-336.