

舒昆慧, 张 丽, 伍玲丽, 等. 纳米银对四种不同性质土壤微生物量及酶活性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2018, 37(5): 907–914.

SHU Kun-hui, ZHANG Li, WU Ling-li, et al. Effects of silver nanoparticles on microbial communities and enzyme activity in four soils[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2018, 37(5): 907–914.

纳米银对四种不同性质土壤微生物量及酶活性的影响

舒昆慧, 张 丽, 伍玲丽, 司友斌*, 刘沁雪

(安徽农业大学资源与环境学院, 农田生态保育与污染防治安徽省重点实验室, 合肥 230036)

摘 要:为研究纳米银在土壤中的微生物毒性, 采用室内培养方式, 探究纳米银(0、10、50、100 mg·kg⁻¹)对4种不同性质土壤中微生物数量、多样性、呼吸作用及酶活性的影响。结果显示, 低剂量(10 mg·kg⁻¹)纳米银对土壤微生物影响较小, 中高剂量(50、100 mg·kg⁻¹)纳米银处理下土壤可培养微生物数量显著降低。随着纳米银剂量的增加, 黄褐土酸杆菌门(Acidobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、蓝菌门(Cyanobacteria)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)、厚壁菌门(Firmicutes)群落丰度显著下降; 变形菌门(Proteobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)群落丰度显著增加。纳米银处理土壤呼吸作用减弱, 土壤脲酶、蔗糖酶活性显著抑制, 而荧光素二乙酸酯酶(FDA酶)、过氧化氢酶活性受纳米银剂量影响没有显著变化。同剂量纳米银处理下黄褐土、砖红壤中微生物性状因子对纳米银的响应强于水稻土和黄棕壤。多变量主成分分析显示, 纳米银对真菌、FDA酶、过氧化氢酶的抑制与土壤有机质、砂粒含量正相关, 对脲酶、蔗糖酶、呼吸作用的抑制与土壤pH值、阳离子交换量(CEC)正相关。综上分析, 纳米银进入土壤后会对土壤微生物产生毒性作用, 抑制微生物的生长繁殖, 但不同门类微生物对纳米银的敏感程度不同, 且纳米银的毒性受土壤性质的影响。

关键词: 纳米银; 微生物多样性; 酶活性; 土壤; 主成分分析

中图分类号: S154 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2018)05-0907-08 doi:10.11654/jaes.2017-1325

Effects of silver nanoparticles on microbial communities and enzyme activity in four soils

SHU Kun-hui, ZHANG Li, WU Ling-li, SI You-bin*, LIU Qin-xue

(Anhui Province Key Laboratory of Farmland Ecological Conservation and Pollution Prevention, School of Resources and Environment, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: In order to evaluate the microbial toxicity of silver nanoparticles (AgNPs) in soils, incubation experiments were conducted to investigate the effects of AgNPs (0, 10, 50, and 100 mg·kg⁻¹ soil) on microbial biomass, diversity, respiration, and enzyme activity in four different soils. The results showed that a low AgNP content (10 mg·kg⁻¹) had little effect on soil microbes while high contents (50 and 100 mg·kg⁻¹) significantly decreased microbial numbers (bacteria, fungi, and actinomycetes). The richness of the soil bacterial community (Acidobacteria, Actinobacteria, Cyanobacteria, Nitrospirae, and Firmicutes) significantly decreased with increasing AgNPs content, whereas that of several other phyla (e.g. Proteobacteria and Planctomycetes) increased. The soil urease and invertase activities were significantly inhibited, while fluorescein diacetate (FDA) and catalase activities were not pronouncedly changed by the AgNPs content. For the same AgNPs content, the responses of the microbe traits in yellow cinnamon soils and laterite were stronger than those in paddy soil and yellow brown soil. Multivariate principal component analysis suggested that the inhibition of fungi number, FDA enzymes, and catalase activities were positively correlated with soil organic matter and sand contents. The inhibition of urease, invertase activities, and respiration by AgNPs were positively correlated with soil pH and cation exchange capacity. We conclude that AgNPs play a toxic role on soil microbes, and inhibit the growth and reproduction of microorganisms. However, the sensitivity of different microbes to AgNPs is different, and the toxicity of AgNPs can be affected by soil properties.

Keywords: silver nanoparticles; microbial diversity; enzyme activity; soil; principal component analysis

收稿日期: 2017-09-26 录用日期: 2017-12-14

作者简介: 舒昆慧(1991—), 女, 安徽池州人, 硕士研究生, 主要从事土壤微生物生态研究。E-mail: 794666557@qq.com

*通信作者: 司友斌 E-mail: youbinsi@ahau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(41430752); 农田生态保育与污染防治安徽省重点实验室开放基金(FECP201705)

Project supported: The Key Program of the National Natural Science Foundation of China(41430752); Anhui Province Key Laboratory of Farmland Ecological Conservation and Pollution Prevention(FECP201705)

银纳米粒子(AgNPs)是经济合作与发展组织(OECD)列出的需要优先进行安全性研究的纳米材料之一^[1],因其独特的广谱抗菌性被广泛应用于生产生活中。随着含纳米银产品消费量的增加,空气、水、土壤及生物体暴露于纳米银环境的几率增加^[2]。调查显示,2010年全球所生产的26万~30.9万t纳米材料有63%~91%以垃圾填埋的方式处理,剩余的排入土壤(8%~28%)、水体(0.4%~7%)和大气(0.1%~1.5%)^[3]。模型预测纳米银在土壤和污泥中的浓度分别为0.02、4.4 mg·kg⁻¹^[4-5],而美国环境保护署(EPA)在污泥中测得的银离子浓度范围为2~195 mg·kg⁻¹,平均值为(20±22) mg·kg⁻¹^[6]。活性污泥在被用于农田肥料、固废填埋或在废物处理厂进行焚烧的过程中会导致纳米银进入陆生系统,同时通过雨水淋洗进入下层土壤或者地下水中^[7]。水生生物可能因废水中出现纳米银颗粒受到伤害^[8],纳米银也会通过污泥农用影响土壤环境^[9]。

最近的研究表明纳米颗粒在土壤中的积累可能影响微生物的活性和多样性。比如纳米氧化锌(ZnO)具有破坏土壤中常见细菌铜绿假单胞菌的能力^[10];含Ag 140 μg·kg⁻¹修饰的有机污泥能使土壤中柔枝莠竹(*Microstegium vimineum*)的生物量降低32%^[11];浓度为32 μg·kg⁻¹和320 μg·kg⁻¹的纳米银显著降低土壤中微生物的生物量^[12]。目前,人们对纳米银的研究主要集中在微生物毒性方面,对纳米银直接作用于土壤环境的研究很少。大多数研究表明纳米银的毒性主要来自于释放的银离子和其自身的特异性效应,如氧化应激和细菌的直接作用^[13]等,纳米银的反应性和杀菌性能则取决于其尺寸、形状和形态^[14]。银对土壤有机物和硫醇化合物具有高亲和力,可能对土壤微生物产生直接的影响,对富含氨基酸的土壤酶产生间接影响^[15]。纳米银对土壤的污染可以通过生物地球化学过程表现出来,包括营养循环和大部分微生物介导的过程。

土壤是一个由矿物、有机颗粒与液相、气相结合组成的复杂多孔体系,土壤环境(包括土壤生物、有机质等)与纳米材料相互作用,改变其表面性质,进而影响纳米材料的反应活性、稳定性、移动性、生物有效性乃至毒性^[16-17]。这些复杂的相互作用显著影响了土壤生态系统中纳米材料环境行为与环境效应,增加了纳米材料生态风险评估的不确定性,亟需更深入的研究^[18]。

本文通过外源添加纳米银的方式,研究纳米银对不同性质土壤中微生物数量、底物呼吸及不同种类酶活性的影响,并利用统计分析等手段进一步探究土壤特性与纳米银毒性之间的关系,为纳米银的土壤环境

影响评价提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料

纳米银粉末,购于南京埃瑞普纳米材料有限公司,纯度≥99%。灰色,平均粒径20~80 nm、比表面积2.5~15 m²·g⁻¹、松装密度0.25~0.6 g·m⁻³,无包裹,其形态和粒径如图1所示。

1.1.2 土壤样品采集

土壤样品分别采自安徽合肥的水稻土、黄棕壤、黄褐土以及广东肇庆的砖红壤,采样深度为0~20 cm。采集土样后及时拣出可见植物残体、根系及土壤动物,风干后过20目筛,充分混匀装袋,备用,供试土壤基本理化性质见表1。

1.2 试验设计

根据美国EPA调查推测施用污泥农田土壤纳米银可累积到10 mg·kg⁻¹,据此本试验设计土壤纳米银为低(10 mg·kg⁻¹)、中(50 mg·kg⁻¹)、高(100 mg·kg⁻¹)3种剂量。将土壤样品置于28℃恒温恒湿培养箱中培育一周,培养期间称重法调节土壤含水量,使其保持一致。培养结束后,采用干混法将纳米银与少量风干土混合均匀后再加入新鲜过筛土壤,使得土壤中纳米银

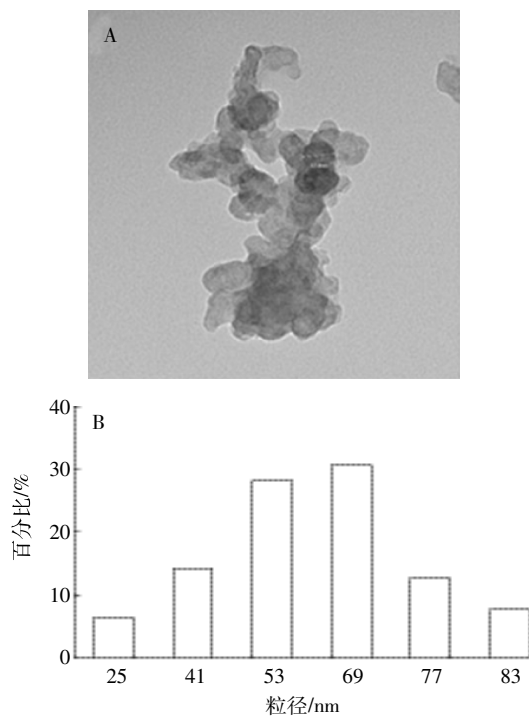


图1 纳米银 TEM 图(A)和粒径分布图(B)

Figure 1 TEM image(A) and distribution of particulate sizes(B) of silver nanoparticles

表 1 供试土壤的基本理化性质

Table 1 Basic physical and chemical properties of the experimental soils

土壤类型	pH	CEC/cm ^{ol} ·kg ⁻¹	有机质/g·kg ⁻¹	砂粒/%	粉粒/%	黏粒/%	田间最大持水量/%
水稻土	8.20	19.10	5.57	5.90	72.70	21.40	44.05
黄棕壤	6.30	15.37	8.65	10.60	58.60	30.80	45.68
黄褐土	6.70	12.40	19.06	16.10	55.00	28.90	42.38
砖红壤	5.54	13.40	33.24	19.20	53.70	27.10	58.58

注:水稻土采样点原本是旱地后改为水稻种植,故有机质含量较低。

Note: The sample point of paddy soil is dry land before rice cultivation, so organic matter content is low.

含量分别为 10、50、100 mg·kg⁻¹ 干土, 不加纳米银土壤为对照, 每处理 3 次重复。调节土壤含水量至田间最大持水量 60%, 置于 28 ℃ 恒温恒湿培养箱中继续培养, 按时取样。

1.2.1 土壤可培养微生物数量测定

供试土壤培养 7 d 后, 采用系列稀释平板培养法对不同剂量纳米银暴露土壤样品分别进行细菌、真菌、放线菌数量的测定, 培养基分别为牛肉膏蛋白胨琼脂培养基、马丁氏培养基及改良高氏一号培养基。

1.2.2 土壤微生物多样性测定

称取 0.5 g 培养 7 d 含不同剂量纳米银的黄褐土, 按照 FastDNA SPIN Kit for soil 试剂盒进行土壤微生物总 DNA 的提取, 利用通用引物(515F-907R)扩增土壤微生物 DNA 的 16S rRNA 基因, 采用 Illumina MiSeq platform 测序平台对 V4 区进行测序^[19-20]。

1.2.3 土壤诱导呼吸测定

称取 20.0 g(干土)不同剂量纳米银处理 7 d 的土壤样品, 分别放入 250 mL 锥形瓶中, 加入葡萄糖粉剂(6 mg·g⁻¹ 干土), 反应 30 min 后用密封胶将锥形瓶密封, 置于 25 ℃ 培养箱中培养 2 h。培养结束后用注射器抽取 5 mL 气体样品采用气相色谱仪测定 CO₂ 含量。土壤诱导呼吸量为单位时间(h)内单位烘干土壤(g)释放的 CO₂(μL)含量^[21]。

1.2.4 土壤酶活性测定

供试土壤培养 7 d 后取样测定土壤脲酶、蔗糖酶、荧光素二乙酸酯酶(FDA 酶)、过氧化氢酶活性, 测定方法参见《土壤与环境微生物研究法》^[21]。土壤脲酶测定采用苯酚钠-次氯酸钠比色法, 其活性以每克土壤 24 h 酶解尿素产生铵态氮(NH₄⁺-N)的毫克数来表示; FDA 酶采用比色法测定, 其活性以每克土 20 min 内生成的荧光素表示; 蔗糖酶采用二硝基水杨酸比色法测定, 其活性以 37 ℃ 下每克土 24 h 后的葡萄糖量表示; 过氧化氢酶采用高锰酸钾滴定法测定, 其活性以每克土 30 min 分解 H₂O₂ 的毫克数表示。

1.3 数据处理与分析

利用 Excel 2007 处理实验数据, SPSS 18.0 分析数据, 以 Canoco 4.5 软件完成变量之间的 PCA 相关性分析, 采用 Origin 8.5 绘图。

2 结果与分析

2.1 纳米银对土壤可培养微生物数量的影响

纳米银对不同性质土壤中可培养微生物数量产生不同程度影响(图 2)。水稻土中细菌数量在低剂量(10 mg·kg⁻¹)纳米银处理下显著降低, 中高剂量(50、100 mg·kg⁻¹)处理显著低于低剂量处理, 但不同剂量纳米银对放线菌、真菌的影响均不显著。低剂量纳米银对黄棕壤可培养微生物影响较小, 中高剂量下细菌、放线菌、真菌数量显著降低。不同剂量纳米银显著抑制黄褐土中可培养微生物的生长, 随着纳米银剂量的增加抑制作用也逐渐增强。低剂量纳米处理下, 黄褐土中放线菌、真菌数量分别减少 86.8% 和 58.3%, 而中高剂量下细菌、放线菌、真菌数量都减少 80% 以上, 可见黄褐土中微生物对纳米银极为敏感。纳米银对砖红壤的影响与黄褐土相似, 不同的是纳米银对砖红壤微生物的抑制强度略低于黄褐土。

从结果可以看出水稻土中对纳米银最敏感的是细菌, 黄棕壤中微生物对纳米银有一定的耐受力, 高剂量下才会有所减少, 黄褐土、砖红壤中微生物对纳米银都很敏感, 尤其是高剂量纳米银处理下, 微生物数量出现大幅降低。因此, 供试 4 种土壤可培养微生物对纳米银的敏感程度为黄褐土>砖红壤>水稻土>黄棕壤。

2.2 纳米银对土壤微生物多样性的影响

通过对黄褐土微生物 16S rRNA 基因 MiSeq 高通量测序, 得到微生物门水平的相对丰度。不同剂量纳米银对黄褐土微生物主要门类没有明显影响, 但对微生物群落丰度产生影响(图 3)。纳米银暴露的土壤中变形菌门(Proteobacteria, 25.4%~35.9%)、酸杆菌门

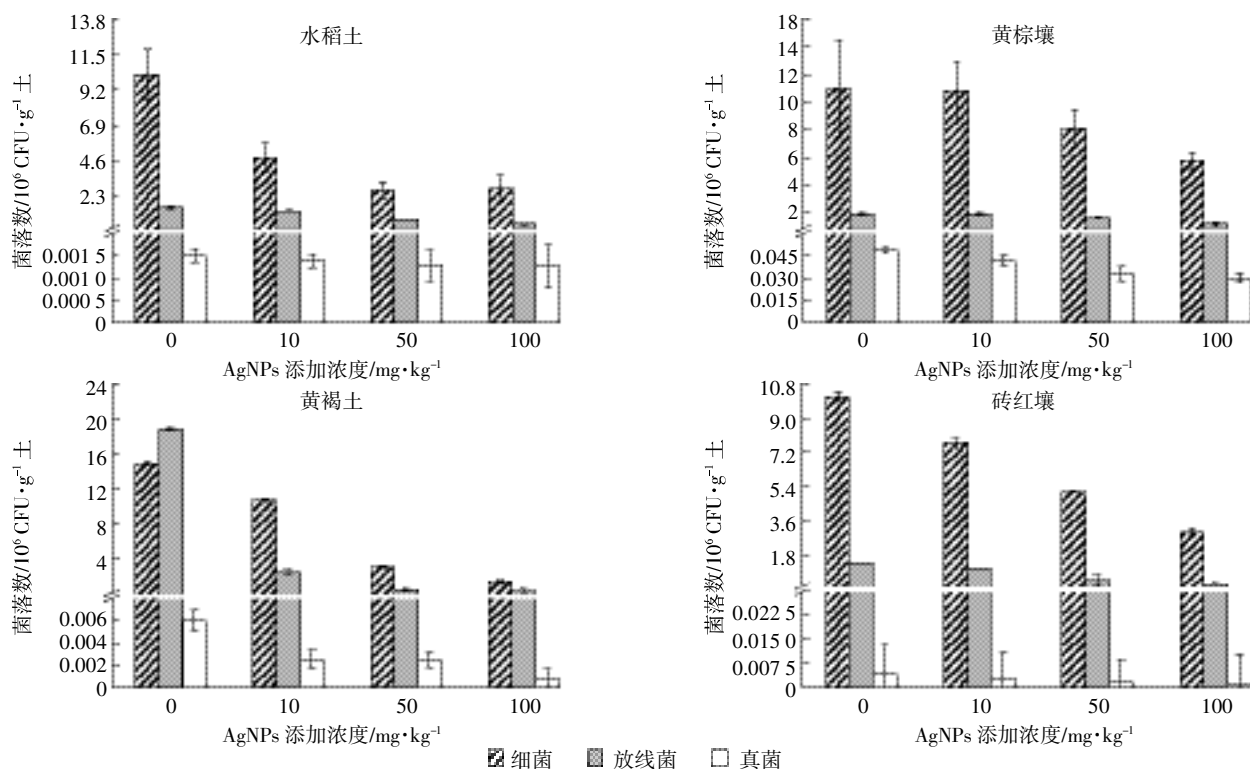


图 2 纳米银对土壤微生物数量的影响

Figure 2 Effect of AgNPs on soil microbial quantity

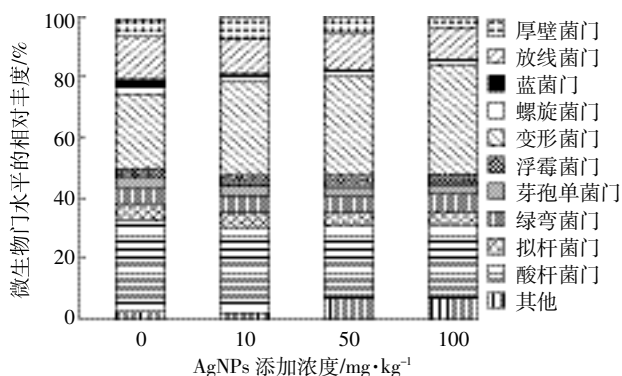


图 3 纳米银处理对黄褐土微生物群落结构的影响

Figure 3 Effect of different contents AgNPs treatment on microflora in yellow cinnamon soils

(Acidobacteria, 23.7%~30.1%)和放线菌门(Actinobacteria, 10.3%~14.1%)为土壤的主导微生物门类,约占有微生物总丰度的 60%以上。其中螺旋菌门(Nitrospirae, 1.6%~2.2%)、厚壁菌门(Firmicutes, 3.7%~6.6%)、蓝菌门(Cyanobacteria, 0.4%~2.6%)、放线菌门(Actinobacteria, 10.3%~14.1%)、酸杆菌门(Acidobacteria, 23.7%~30.1%)对纳米银敏感度较高,随着纳米银剂量增加群落丰度下降。土壤纳米银含量为 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,土壤中酸杆菌门群落相较于对照丰度下降了 25.1%,而变形菌门群落相较于对照组丰度上升了 41.3%。浮霉菌门(Planctomycetes)和芽孢杆菌门

(Gemmatimonadetes)群落丰度随纳米银含量增加而上升。同时,绿弯菌门(Chloroflexi)和拟杆菌门(Bacteroidetes)在不同纳米银含量土壤中群落丰度变化不大。

2.3 纳米银对土壤呼吸的影响

土壤诱导呼吸量可以反映出土壤生物量的大小(图 4)。通过对纳米银暴露 7 d 的土壤进行底物诱导呼吸,发现 4 种土壤中纳米银处理组呼吸强度均低于对照组,并且随着纳米银剂量的增加,呼吸作用逐渐减弱。低剂量纳米银处理下,土壤呼吸作用没有受到显著影响,中高剂量纳米银显著抑制土壤呼吸,高剂量下水稻土、黄棕壤、黄褐土、砖红壤呼吸作用分别降低 23.8%、15.9%、29.3%、14.5%。可见,纳米银的加入会减少土壤生物量,导致土壤微生物过程减弱,这与高通量测序的结果相一致。

2.4 纳米银对土壤酶活性的影响

添加不同剂量纳米银对 4 种土壤酶活性产生不同程度的影响(图 5)。低剂量纳米银处理下,水稻土的脲酶、FDA 酶,黄棕壤的蔗糖酶活性有明显的升高;黄褐土、砖红壤酶活性降低。中剂量纳米银处理下,4 种土壤脲酶、蔗糖酶活性显著降低,水稻土和黄棕壤的 FDA 酶、过氧化氢酶,黄褐土 FDA 酶活性受到轻微抑制,未达到显著影响。高剂量纳米银处理下,

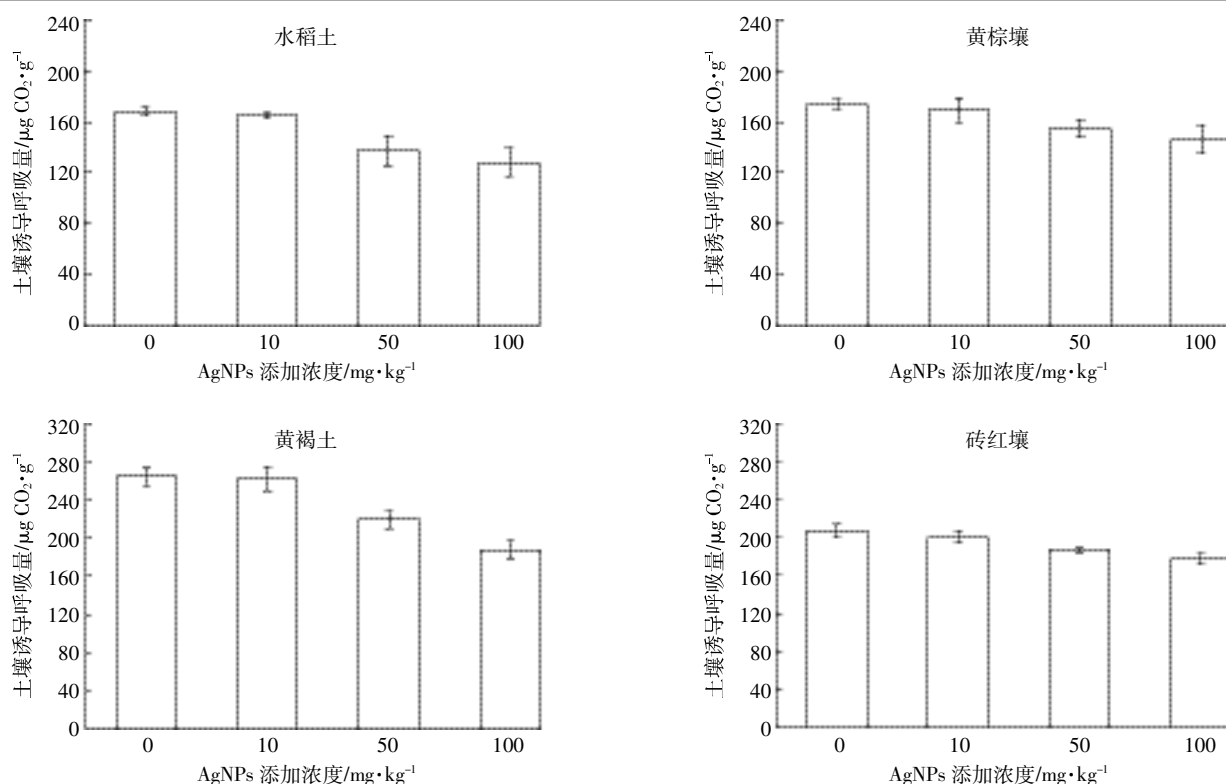


图 4 纳米银对土壤诱导呼吸量的影响

Figure 4 Effect of AgNPs on substrate induced respiration in soils

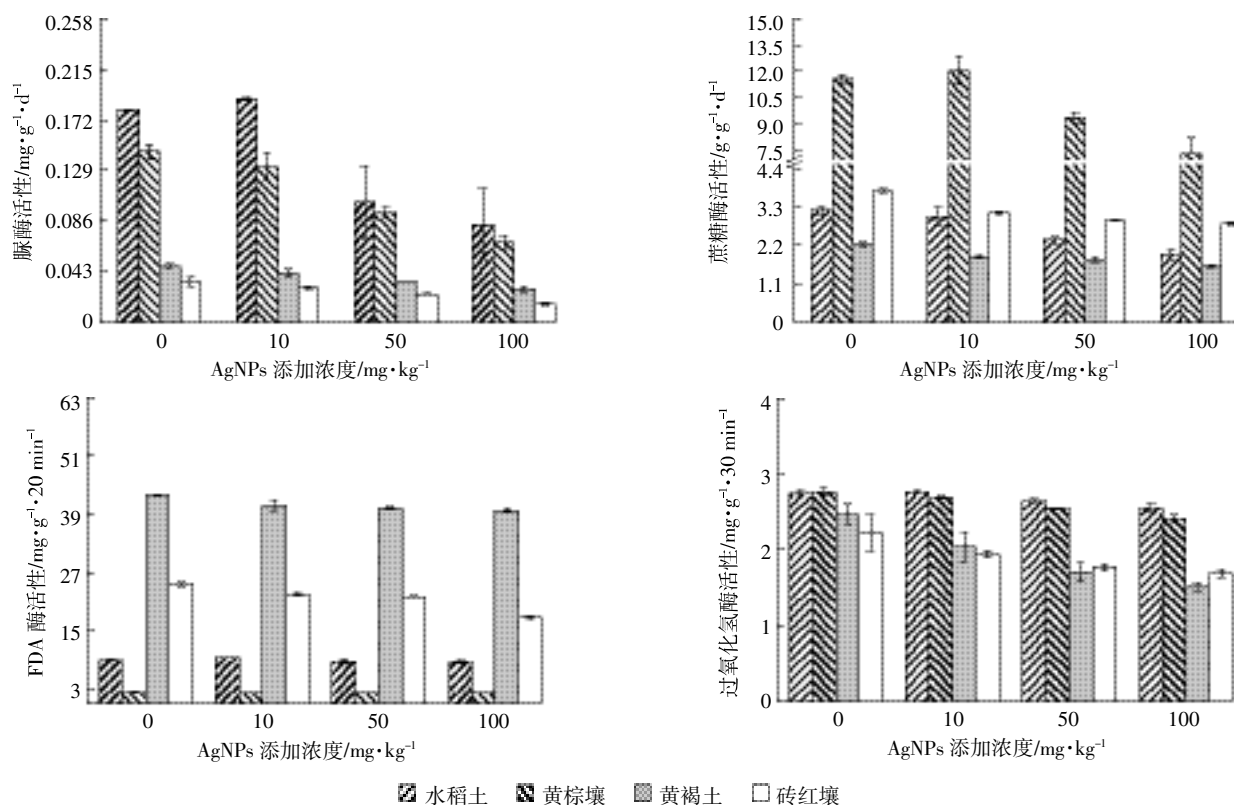


图 5 不同纳米银处理下土壤酶活性

Figure 5 Effect of different contents AgNPs on enzyme activities in soils

水稻土和黄棕壤的脲酶、蔗糖酶,黄褐土脲酶、蔗糖酶、过氧化氢酶,以及砖红壤酶活性均显著降低。说明纳米银的添加会影响土壤微生物酶过程,并且这种影响与纳米银的剂量正相关。

此外,纳米银对不同种类酶的影响也不相同,脲酶对纳米银最为敏感,其次是蔗糖酶。高剂量下土壤脲酶活性降低 41.7%~54.0%,蔗糖酶活性降低 24.5%~40.8%。虽然砖红壤 FDA 酶在高剂量纳米银下活性降低 27.8%,但水稻土、黄棕壤、黄褐土中酶活性抑制均不显著(降低 4.5%~7.2%)。纳米银对过氧化氢酶的影响在黄褐土、砖红壤中较为显著,在水稻土、黄棕壤中影响较小。

2.5 土壤环境因子与微生物性状因子之间的相关性分析

加入纳米银后土壤理化性质没有发生明显变化,但纳米银在不同土壤中的微生物毒性却有着较大差异。中剂量(50 mg·kg⁻¹)纳米银处理下土壤各微生物性状因子抑制率(与对照相比)与环境因子进行相关性分析,由表 2 可知纳米银对呼吸作用的抑制与土壤 pH 正相关,对脲酶、蔗糖酶的抑制与土壤 pH 值、CEC 正相关,对 FDA 酶、过氧化氢酶及真菌的抑制与土壤有机质、砂粒含量有一定的相关性,而对细菌、放线菌的抑制与环境因子相关性不高。土壤黏粒含量与各微生物性状因子之间的相关性不高,可能是因为供试土壤黏粒含量较为接近,在分析时无法显示出较大的差别。

环境因子与微生物性状因子主成分分析如图 6 所示,轴 1 和轴 2 的变量解释因子为 96.5%,土壤有机质、砂粒在轴 1 方向上与真菌、FDA 酶、过氧化氢酶等变量相关性较高;土壤 pH、CEC 与脲酶、蔗糖酶相关性高,这与表 2 结果相似。说明纳米银在有机质、砂粒含量高的土壤中对 FDA 酶、过氧化氢酶的毒性作用大,而在 pH、离子强度大的土壤中对脲酶、蔗糖酶及真菌的毒性大。纳米银对土壤呼吸作用的影响主

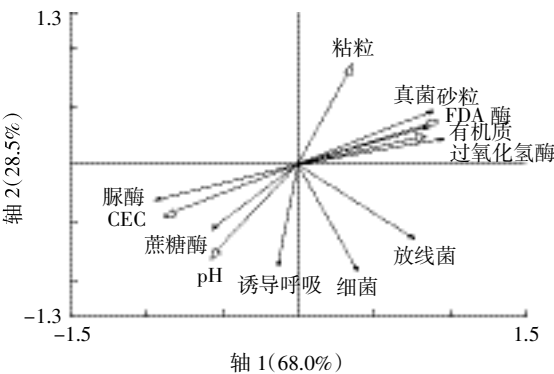


图 6 环境因子-微生物性状因子的 PCA 分析
Figure 6 Principal component analysis of environmental factors and microbial traits factors

要与土壤 pH 值相关,在 pH 值高的土壤中,纳米银对生物量的影响较大。

3 讨论

土壤微生物是维持土壤肥力和作物生产的关键因素^[22],土壤生境的改变会影响微生物数量及群落结构的组成^[23]。平板计数和底物诱导呼吸结果表明纳米银对土壤微生物的生长繁殖具有显著抑制作用。纳米银暴露下土壤细菌、放线菌、真菌数量显著降低,呼吸作用受到抑制,并且这种抑制在低剂量(10 mg·kg⁻¹)下就有所表现,随着纳米银剂量的增加抑制作用逐渐增强。研究发现 10 mg·kg⁻¹ 纳米银可以显著降低土壤真菌的菌落数,100 mg·kg⁻¹ 会显著抑制土壤细菌及放线菌的数量^[24]。当纳米银含量仅为 0.14 mg·kg⁻¹ 时,污泥中微生物生物量与细菌群落组成显著减少^[11];土壤中纳米银浓度高于 20 mg·kg⁻¹ 时,土壤呼吸被明显抑制,且浓度越高抑制作用越大^[25]。纳米银能够破坏细菌的细胞膜,并聚集在细胞膜中,增加细胞通透性,导致细胞死亡^[26];进入细胞内部的纳米银通过浓缩 DNA 使之失去复制能力,引起 DNA 降解从而抑制细菌生长繁殖^[27]。

表 2 环境因子与微生物性状因子相关性
Table 2 Correlation between environmental factors and microbial traits factors

相关性 R	细菌	放线菌	真菌	呼吸量	脲酶	蔗糖酶	FDA 酶	过氧化氢酶
pH	0.568	-0.055	-0.816**	0.882**	0.806**	0.661*	-0.804**	-0.496
CEC	0.055	-0.555	-0.940**	0.418	0.972**	0.868**	-0.717**	-0.902**
有机质	-0.018	0.522	0.913**	-0.540	-0.853**	-0.352	0.998**	0.677*
砂粒	-0.052	0.562	0.992**	-0.527	-0.965**	-0.604*	0.936**	0.828**
黏粒	-0.548	-0.064	0.535	-0.570	-0.600*	-0.885**	0.275	0.453

注:** 在 0.01 水平上显著相关;* 在 0.05 水平上显著相关。
Note: ** Significant correlation at the 0.01 level; * Significant correlation at the 0.05 level.

纳米银进入土壤后增加了细菌的丰富度但并没有改变土壤中主导微生物群落(变形菌门和酸杆菌门)。除主导细菌群落外,螺旋菌门、厚壁菌门、蓝菌门等随纳米银剂量增加群落丰度下降,浮霉菌门和芽孢杆菌门随纳米银剂量增加群落丰度上升,绿弯菌门和拟杆菌门随纳米银剂量增加群落丰度无明显差异。说明土壤生境的变化不会改变主导细菌群落,但会引起群落丰度的变化,且不同细菌门类对纳米银的敏感程度不一样。Kumar 等^[28]发现,纳米银对土壤微生物群落有较高毒性,并可改变群落组成丰度,特别是植物伴生菌;Yang 等^[29]研究表明,纳米银会对活性污泥的微生物群落产生抑制作用,对硝化细菌群落的抑制尤为显著。

不同土壤中不同种类酶对纳米银的响应不同,但整体上土壤酶活性随着纳米银剂量的增加而降低。在测定的4种酶中,纳米银对脲酶的抑制最为显著,对蔗糖酶、FDA酶、过氧化氢酶活性也有一定程度的抑制,这与相关研究结果相似。Shin 等^[30]研究了纳米银对土壤6种酶活性的影响,发现脲酶对纳米银最敏感,而纳米银对FDA酶等影响较小。王秋双等^[24]研究显示纳米银处理显著抑制土壤脲酶、脱氢酶活性,但对土壤过氧化氢酶与磷酸酶活性基本无影响。纳米金属的毒性可能来自于其本身,通过灭活蛋白质组或阻断酶上的结合位点来抑制酶活性^[31],也可能是因其粒径小,易进入微生物内部产生氧化应激,导致生物死亡。ROS(活性氧簇)的累积可能是导致脲酶、磷酸酶活性降低的主要原因^[32],而纳米颗粒本身或其溶解的离子对于土壤生态系统是明显有毒的^[33]。

纳米银对土壤微生物的毒性与土壤理化性质有一定的关系,土壤pH、有机质含量、黏粒分布等都会影响纳米银在土壤中的聚合状态和稳定性。研究发现纳米ZnO的毒性是由离子释放导致的,纳米ZnO对念珠菌的毒性与土壤pH有关,在酸性土壤中毒性更强^[34]。也有研究表明纳米银在酸性土壤中的毒性要强于碱性土壤^[35]。这可能是由于酸性土壤表面的电负性低,对带负电的纳米银静电排斥力更小^[36],易与纳米银结合,从而降低了纳米银在土壤中的迁移性,毒性作用更持久。此外,土壤天然有机质的表面吸附能够防止纳米银的氧化和银离子释放,腐植酸、富里酸能将氧化产物转化成金属从而抑制纳米银的溶解^[37]。但也有研究发现用有机质修饰和未用有机质修饰的土壤中溶解Ag的浓度是相似的^[38],而土壤质地越细,纳米材料的保留率会提高,其生物有效性会降低^[39]。因

此,纳米银进入土壤环境后不仅形态、大小会发生改变,毒性作用也会受到影响,土壤性质则可能是其毒性变化的主要原因。

虽然本研究对纳米银在不同土壤中微生物毒性进行了探讨,对纳米银的微生物毒性大小进行了测定,但是关于纳米银在土壤环境中的转化及毒性作用过程尚不清楚,有待进一步研究。

4 结论

(1)纳米银能抑制土壤细菌、放线菌的数量,对真菌也有一定的抑制作用,剂量越高,抑制作用越明显。

(2)纳米银抑制土壤微生物呼吸作用,使土壤生物量减少。

(3)纳米银对不同土壤中酶活性的影响存在显著差异。纳米银显著抑制黄褐土、砖红壤中蔗糖酶、脲酶、FDA酶、过氧化氢酶活性;对水稻土、黄棕壤中脲酶影响较大,蔗糖酶、FDA酶、过氧化氢酶活性变化较小。

(4)纳米银毒性与土壤性质相关。纳米银对真菌、FDA酶、过氧化氢酶的抑制与土壤有机质、砂粒含量正相关;纳米银对脲酶、蔗糖酶、呼吸作用的抑制与土壤pH值、阳离子交换量正相关。

参考文献:

- [1] Organization for Economic Co-operation and Development(OECD). Publications in the series on the safety of manufactured nanomaterials no. 27: List of manufactured nanomaterials and list of endpoints for phase one of the sponsorship programme for the testing of manufactured nanomaterials[S]. Paris: OECD Publishing, 2010.
- [2] Ma X, Geiser L J, Deng Y, et al. Interactions between engineered nanoparticles(ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation[J]. *Science of the Total Environment*, 2010, 408(16): 3053-3061.
- [3] Keller A A, McFerran S, Lazareva A, et al. Global life cycle releases of engineered nanomaterials[J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 2013, 15(6): 1692.
- [4] Mueller N C, Nowack B. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment[J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(12): 4447-4453.
- [5] Gottschalk F, Sonderer T, Scholz R W, et al. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials(TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions[J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(24): 9216-9222.
- [6] United States Environmental Protection Agency(US EPA). Targeted national sewage sludge survey statistical analysis[R]. Washington DC: US EPA, 2009.
- [7] Blaser S A, Scheringer M, Macleod M, et al. Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: Contribution of nano-functionalized plastics and textiles[J]. *Science of the Total Environment*, 2008,

- 390(2/3):396–409.
- [8] Nowack B, Ranville J F, Diamond S, et al. Potential scenarios for nanomaterial release and subsequent alteration in the environment[J]. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 2012, 31(1):50–59.
- [9] Schlich K, Klawonn T, Tertyze K, et al. Hazard assessment of a silver nanoparticle in soil applied via sewage sludge[J]. *Environmental Sciences Europe*, 2013, 25(1):1–14.
- [10] Vos P, Garrity G, Jones D, et al. Bergey's manual of systematic bacteriology[M]. Volume 3. New York:Springer Verlag, 2009.
- [11] Colman B P, Amaout C L, Anciaux S, et al. Low concentrations of silver nanoparticles in biosolids cause adverse ecosystem responses under realistic field scenario[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2):e57189.
- [12] Hänsch M, Emmerling C. Effects of silver nanoparticles on the microbiota and enzyme activity in soil[J]. *Journal of Plant Nutrition & Soil Science*, 2010, 173(4):554–558.
- [13] Morones J R, Elechiguerra J L, Camacho A, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles[J]. *Nanotechnology*, 2005, 16(10):2346–2353.
- [14] Sotiriou G A, Pratsinis S E. Antibacterial activity of nanosilver ions and particles[J]. *Environment Science & Technology*, 2010, 44(14):5649–5654.
- [15] Wigginton N S, De Titta A, Piccapietra F, et al. Binding of silver nanoparticles to bacterial proteins depends on surface modifications and inhibits enzymatic activity[J]. *Environment Science & Technology*, 2010, 44(6):2163–2168.
- [16] Benmoshe T, Dror I, Berkowitz B. Transport of metal oxide nanoparticles in saturated porous media[J]. *Chemosphere*, 2011, 81(3):387–393.
- [17] Fang J, Shan X Q, Wen B. Stability of titania nanoparticles in soil suspensions and transport in saturated homogeneous soil columns[J]. *Environment Pollution*, 2009, 157(4):1101–1109.
- [18] 周东美. 纳米 Ag 粒子在我国主要类型土壤中的迁移转化过程与环境效应[J]. 环境化学, 2015, 34(4):605–613.
ZHOU Dong-mei. Transport and transformation of nanoAg particle in soils and its environmental effects[J]. *Environmental Chemistry*, 2015, 34(4):605–613.
- [19] Marteinson V T, Runarsson A, Stefansson A, et al. Microbial communities in the subglacial waters of the Vatnajökull ice cap, Iceland[J]. *ISME Journal*, 2013, 7(2):427–437.
- [20] Caporaso J G, Lauber C L, Walters W A, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms[J]. *ISME Journal*, 2012, 6(8):1621–1624.
- [21] 李振高, 骆永明, 滕应. 土壤与环境微生物研究法[M]. 北京:科学出版社, 2008.
LI Zhen-gao, LUO Yong-ming, TENG Ying. Soil and environmental microbiological research[M]. Beijing:Science Press, 2008.
- [22] Carbone S, Vittori A L, Gaggia F, et al. Bioavailability and biological effect of engineered silver nanoparticles in a forest soil[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2014, 280:89–96.
- [23] Hansel C M, Fendorf S, Jardine P M, et al. Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(5):1620–1633.
- [24] 王秋双, 戚兴超, 申天琳, 等. 纳米银与石墨烯对土壤微生物及土壤酶的影响[J]. 环境科学学报, 2017, 37(8):3149–3157.
WANG Qiu-shuang, QI Xing-chao, SHEN Tian-lin, et al. Effect of silver nanoparticles and graphene on soil microorganisms and enzyme activities[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2017, 37(8):3149–3157.
- [25] Rahmatpour S, Shirvani M, Mosaddeghi M R, et al. Dose-response effects of silver nanoparticles and silver nitrate on microbial and enzyme activities in calcareous soils[J]. *Geoderma*, 2017, 285:313–322.
- [26] Soni I, Salopek-Soni B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for gram-negative bacteria[J]. *Journal of Colloid & Interface Science*, 2004, 275(1):177–182.
- [27] 谢小保, 李文茹, 曾海燕, 等. 纳米银对大肠杆菌的抗菌作用及其机制[J]. 材料工程, 2008(10):106–109.
XIE Xiao-bao, LI Wen-ru, ZENG Hai-yan, et al. Study of antimicrobial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli* [J]. *Materials Engineering*, 2008(10):106–109.
- [28] Kumar N, Shah V, Walker V K. Perturbation of an Arctic soil microbial community by metal nanoparticles[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 190(1/2/3):816–822.
- [29] Yang Y, Quensen J, Mathieu J, et al. Pyrosequencing reveals higher impact of silver nanoparticles than Ag^+ on the microbial community structure of activated sludge[J]. *Water Research*, 2014, 48:317–325.
- [30] Shin Y J, Kwak J I, An Y J. Evidence for the inhibitory effects of silver nanoparticles on the activities of soil exoenzymes[J]. *Chemosphere*, 2012, 88(4):524–529.
- [31] Xu C, Peng C, Sun L J, et al. Distinctive effects of TiO_2 and CuO nanoparticles on soil microbes and their community structures in flooded paddy soil[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2015, 86:24–33.
- [32] Pan B, Xing B S. Manufactured nanoparticles and their sorption of organic chemicals[J]. *Advances in Agronomy*, 2010, 108(10):137–181.
- [33] Du W C, Sun Y Y, Ji R, et al. TiO_2 and ZnO nanoparticles negatively affect wheat growth and soil enzyme activities in agricultural soil[J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 2011, 13(4):822–828.
- [34] Waalewijn-Kool P L, Ortiz M D, Lofts S, et al. The effect of pH on the toxicity of zinc oxide nanoparticles to *Folsomia candida* in amended field soil[J]. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 2013, 32(10):2349–2355.
- [35] Schlich K, Hund-Rinke K. Influence of soil properties on the effect of silver nanomaterials on microbial activity in five soils[J]. *Environmental Pollution*, 2015, 196:321–330.
- [36] 杜欢, 王玉军, 李程程, 等. 纳米 Ag 在四种不同性质土壤上的吸附行为研究[J]. 农业环境科学学报, 2015, 34(6):1069–1075.
DU Huan, WANG Yu-jun, LI Cheng-cheng, et al. Sorption of silver nanoparticles on four soils with different characteristics[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2015, 34(6):1069–1075.
- [37] Liu J, Hurt R H. Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(6):2169–2175.
- [38] Peyrot C, Wilkinson K J, Desrosiers M, et al. Effects of silver nanoparticles on soil enzyme activities with and without added organic matter[J]. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 2014, 33(1):115–125.
- [39] Hund-Rinke K. Fate and bioavailability of engineered nanoparticles in soils: A review[J]. *Critical Reviews in Environmental Science & Technology*, 2014, 44(24):2720–2764.