

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 Ling-li, YANG Yu-rong, ZHANG Li, 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.

纳米银对土壤固氮微生物群落结构及固氮活性的影响

伍玲丽, 杨玉蓉, 张 丽, 刘小红, 司友斌*

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

摘 要:为评估纳米银在土壤环境中的风险, 采用土壤培养方式, 比较了不同浓度 10 nm 的纳米银 (10、25、50 mg·kg⁻¹) 和 50 nm 的纳米银 (25、50、100 mg·kg⁻¹) 暴露对土壤固氮微生物数量、群落组成以及固氮作用的影响。结果表明: 纳米银暴露下土壤固氮微生物的种类减少, 且慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、流行杆菌属 (*Vulgatibacter*) 和厌氧黏细菌属 (*Anaeromyxobacter*) 的相对丰度降低, 而固氮弧菌属 (*Azoarcus*) 的丰度上升, 群落组成发生明显变化; 10 nm 的纳米银暴露 7 d 对固氮微生物群落结构的影响最大, 50 nm 的纳米银暴露 90 d 固氮微生物群落结构变化最小; 10 nm 和 50 nm 的不同剂量纳米银暴露 28 d, 土壤自生固氮菌数量下降 18.96%~47.28% 和 17.42%~27.78%; 土壤固氮活性随着纳米银暴露时间的延长而降低, 10 nm 和 50 nm 的不同剂量纳米银暴露 90 d 后, 土壤固氮酶活性下降了 14.55%~27.47% 和 17.87%~21.79%。研究表明, 纳米银对土壤固氮微生物及固氮作用具有负面影响, 且影响程度与其尺寸、剂量以及暴露时间有关。

关键词: 纳米银; 固氮微生物; 群落结构; 固氮活性; 土壤

中图分类号: S154.3 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2019)12-2757-07 doi:10.11654/jaes.2019-0803

Effects of silver nanoparticle (AgNP) on soil nitrogen-fixing microbial community structure and nitrogenase activity

WU Ling-li, YANG Yu-rong, ZHANG Li, LIU Xiao-hong, SI You-bin*

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

Abstract: To evaluate the possible risks of silver nanoparticles (AgNP) in soil environments, culture experiments were carried out to study the effects of 10 nm (10, 25, and 50 mg·kg⁻¹) and 50 nm (25, 50, and 100 mg·kg⁻¹) AgNP on nitrogenase activity and the quantity and community structure of nitrogen-fixing microorganisms. The results showed that the number of nitrogen-fixing microorganisms declined; the relative abundance of *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Vulgatibacter*, and *Anaeromyxobacter* decreased. In contrast, the relative abundance of *Azoarcus* increased in the AgNP-treated soils. In addition, the community structure of nitrogen-fixing microorganisms changed significantly upon exposure to AgNP in soil. The largest impact of soil AgNP on the structure of the nitrogen-fixing microbial community was seen for 10 nm AgNP applied for 7 days, while the smallest effect was seen for 50 nm AgNP applied for 90 days. The number of *Azotobacter* decreased by 18.96%~47.28% and 17.42%~27.78% after 28 days of soil exposure with different doses of 10 nm and 50 nm AgNP, respectively. Nitrogenase activity also decreased with exposure time, and by 14.55%~27.47% and 17.87%~21.79% after 90 days of soil exposure with different doses of 10 nm and 50 nm AgNP, respectively. In conclusion, AgNP have negative effects on soil nitrogen fixing microorganisms and nitrogenase activity, which are related to the AgNP size, dose, and exposure time.

Keywords: silver nanoparticle (AgNP); nitrogen-fixing microorganisms; community structure; nitrogenase activity; soil

收稿日期: 2019-07-18 录用日期: 2019-09-24

作者简介: 伍玲丽 (1994—), 女, 安徽芜湖人, 硕士研究生, 主要研究方向为土壤微生物生态。E-mail: 1836248629@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)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China (41430752)

纳米银(AgNP)与传统的银颗粒相比具有耐高温、电导率高和电阻率相对较低等理化性质以及抗菌特性,因此在食品包装、个人护理品和其他产品中得到了广泛的应用^[1-2]。据统计,目前全球对AgNP的消费高达5.5~550 t·a⁻¹^[3]。然而,AgNP的广泛使用增加了其释放到环境中的风险,环境中的AgNP颗粒通过大气沉降、污水灌溉、垃圾填埋等方式最终汇集于土壤,预测AgNP在土壤中每年可增加1.2~2.3 ng·kg⁻¹^[4]。美国EPA调查推测,10年后农田土壤中AgNP可累积到10 mg·kg⁻¹^[5]。从2013年开始,AgNP的环境毒性引起了广泛的关注^[6]。研究表明AgNP对土壤微生物具有毒害作用^[7-9]。

氮循环是影响陆地生态系统生产力可持续性发展的重要物质循环^[10]。其中,固氮微生物在调节土壤氮素转化中起着关键作用。生物固氮是陆地及其他环境中氮素最主要的天然来源^[11],生态系统中绝大多数生物可利用形式的氮主要来源于土壤固氮微生物群落(如蓝细菌、假单胞菌、固氮螺菌和固氮菌)的生物固氮作用^[12]。它们通过固氮酶将大气N₂转化为植物有效氮,从而为生态系统提供额外的氮源^[13]。其中*nifH*基因编码的固氮酶普遍存在于固氮微生物中^[14]。编码这种酶的*nifH*基因在细菌和古细菌结构域中高度保守,可为研究固氮菌群落提供依据,因此已被广泛用作研究固氮微生物多样性和丰度的遗传标记物^[15]。

AgNP的毒性机制主要有:与细胞膜相互作用,损伤细胞结构;造成细胞内活性氧(ROS)累积,导致细胞氧化损伤;AgNP或释放的Ag⁺穿透细胞膜进入细胞内部,破坏DNA复制等^[16-19]。但关于AgNP释放的Ag⁺的毒性大小一直存在争议。前期研究发现,AgNP和Ag⁺对土壤中硝化微生物及其氨氧化速率都有负面影响,但Ag⁺的影响程度比AgNP低^[20]。有研究表明Ag⁺的毒性具有即时性,而AgNP的毒性具有长期性^[21]。目前,关于AgNP对土壤固氮微生物的影响研究较少,尤其是自生固氮作用。自生固氮菌容易受到温度、水分和养分等环境因素的影响。此外,重金属也会造成固氮菌群数量的改变^[22]。Kumar等^[23]发现AgNP、纳米铜(CuNP)、纳米硅(SiNP)对极地土壤微生物均产生毒害作用,其中AgNP能显著抑制固氮菌的活性。Arnaout等^[24]研究也证实AgNP可扰乱土壤中的氮循

环。释放到土壤环境中的AgNP可能对土壤固氮产生负面作用,因此有必要研究AgNP对土壤固氮微生物及固氮作用的影响。

本文针对AgNP的环境暴露,利用高通量测序技术比较了不同浓度10 nm的AgNP(10、25、50 mg·kg⁻¹)和50 nm的AgNP(25、50、100 mg·kg⁻¹)暴露对土壤固氮微生物多样性及群落组成的影响,并对AgNP暴露下土壤自生固氮菌数量以及固氮酶活性进行了测定,以期为AgNP的土壤微生物效应及对氮循环影响的研究提供支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 供试材料

10 nm的AgNP购于南京先丰纳米有限公司,平均粒径为10±5 nm,形态如图1A所示。50 nm的AgNP购于南京埃瑞普纳米材料有限公司,平均粒径为50±5 nm,形态如图1B所示。

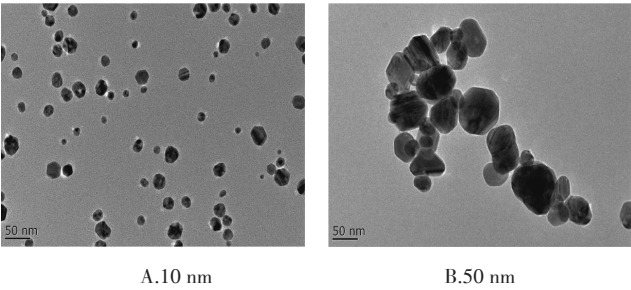


图1 两种粒径纳米银透射电镜图

Figure 1 Transmission electron microscope(TEM) images of AgNP of two sizes

1.1.2 土壤样品采集及培养

供试土壤为黄褐土,采自安徽省合肥市包河区大圩镇(31°46' N, 117°22' E),采样深度为0~20 cm。土壤采集后取出其中的植物根和残叶,过20目筛备用。土壤理化性质的测定参见《土壤农化分析》^[25],测定结果如表1所示。将新鲜土壤过20目筛后放置于30℃恒温箱中预培育7 d。将两种粒径的AgNP与少量风干土混合后再与培育后的约100 g鲜土混合均匀,土壤中10 nm的AgNP(nAg10)终浓度为10、25、50 mg·kg⁻¹,50 nm的AgNP(nAg50)终浓度为25、50、

表1 土壤样品的基本理化性质

Table 1 Basic physical and chemical properties of measured soil

土壤类型Soil type	pH	有机质Organic matter/g·kg ⁻¹	CEC/cmol·kg ⁻¹	砂粒Sand/%	粉粒Silt/%	黏粒Cosmid/%
黄褐土 Yellow cinnamon soil	6.50	8.65	15.37	10.60	58.60	30.80

100 mg·kg⁻¹。将混合后的土壤样品放于30℃的恒温箱中培养,调节土壤含水量至田间最大持水量的60%,定时取样,每组3个重复。

1.2 AgNP对土壤固氮微生物群落结构的影响

1.2.1 土壤样品前处理

称取200 mg两种粒径AgNP最高剂量暴露7 d(nAg10S和nAg50S)和90 d(nAg10L和nAg50L)的土壤,将其放入灭菌后的2 mL离心管中,并加入1 mL 70%的乙醇,混合均匀后高速(10 000 r·min⁻¹)离心3 min,去除上清液。加入磷酸缓冲液(PBS),以相同的转速离心3 min后再倒去上清液。最后将离心管于55℃烘10 min,使残留乙醇完全挥发。同时未添加AgNP的土壤作为对照组(CK)。

1.2.2 土壤DNA的提取及PCR扩增

按照E.Z.N.A Mag-Bind Soil DNA(OMEGA)试剂盒进行土壤微生物总DNA的提取,用*nifH*基因作为特异性引物^[15]。定量PCR反应体系为:2×Taq master Mix 15 μL,上下游引物(10 μmol·L⁻¹)各1 μL, Genomic DNA 10~20 ng,加dd H₂O至30 μL。PCR扩增引物及反应条件见表2。

1.2.3 Illumina Miseq测序及生物信息学分析

DNA纯化回收和定量混合后利用Illumina Miseq测序平台进行高通量分析,上机前保证其终浓度为20 pmol·L⁻¹。测序服务委托生工生物工程(上海)股份有限公司完成。高通量测序得到的双端序列数据使用FastQC进行质量控制,去除低质量序列和嵌合体序列。OTU(Operational taxonomic units)指人为给每个分类单元设置的同一标志,通常对97%相似水平下的OTU进行生物信息统计分析^[26]。使用Usearch进行OTU聚类,然后根据样本分析所得OTU情况使用QIIME(Quantitative insights into microbial ecology)中的alpha_diversity分析模块进行Alpha多样性分析。

1.3 土壤自生固氮细菌数量测定

AgNP处理7、28、60、90 d后,选择Ashby培养基,采用MPN稀释法测定土壤自生固氮菌的数量^[27]。培养基成分如下:甘露醇10.0 g, KH₂PO₄ 0.2 g, NaCl 0.2 g, CaCO₃ 5.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, CaSO₄·2H₂O 0.1 g, 蒸馏水1000 mL,调节pH至6.8~7.0。

1.4 土壤固氮活性测定

根据固氮微生物体内的固氮酶可将C₂H₂还原为C₂H₄的能力,采用C₂H₂还原法测定土壤的固氮作用,固氮酶活性由每克干土每小时乙稀产生的纳摩尔数(nmol·h⁻¹·g⁻¹)来表示^[28]。将两种粒径AgNP暴露后的土壤(20 g)放入无菌气密玻璃瓶中,用葡萄糖调节土壤含碳量使其达到1 mg·g⁻¹,用纯C₂H₂气体(99.99%)代替10%的瓶内空气(10 mL)。将所有土壤样品在28℃下温育48 h,并使用气相色谱(GC-7890B,安捷伦,美国)测定C₂H₄浓度。检测器为FID,色谱柱为Agilent 19095P-Q04 HP-plot,毛细管柱为30 m×0.350 mm×40 μm,检测条件为检测器温度150℃,柱温40℃,进样温度150℃,载气为N₂,燃气为H₂,空气流速为400 mL·min⁻¹。

1.5 数据处理

数据采用SPSS 19.0进行统计分析,并对不同处理间的数据采用单因素方差分析(ANOVA)和Duncan多重比较进行显著性差异检验,Origin 9.0和R语言程序包(Venn图采用VennDiagram软件包,热图采用pheatmap软件包)作图。

2 结果与分析

2.1 AgNP暴露下土壤固氮微生物 OTU 数量及 Venn 图分析

AgNP暴露下土壤固氮微生物 OTU 数量变化如图2A所示,未添加AgNP的土壤固氮微生物的 OTU 数目最多,所含的微生物种类最丰富,两种粒径不同浓度AgNP暴露下土壤固氮微生物数量均有所下降。图2B中CK组土壤特有 OTU 的数目为2166, nAg10S、nAg10L、nAg50S和nAg50L各处理组的土壤独有 OTU 数目分别为683、768、784和1144。10 nm和50 nm的AgNP暴露7 d和90 d后土壤固氮微生物 OTU 数量差异不显著。

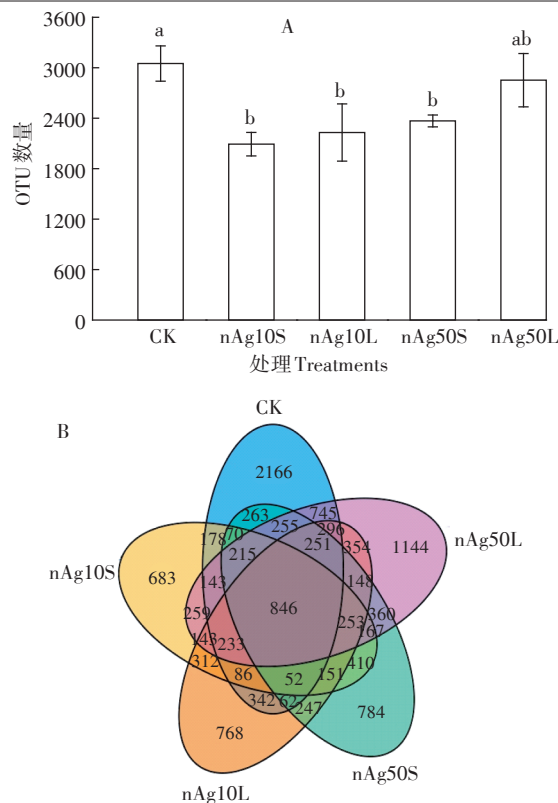
2.2 AgNP暴露下土壤固氮微生物的主要组成及丰度变化

热图根据颜色的深度来定义群落分布丰度,结果更直观,更清晰。属水平上丰度前10的物种热图分析见图3。横向是固氮微生物根据进化关系的聚类

表2 PCR扩增引物及反应条件

Table 2 PCR amplification primers and reaction conditions

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	反应条件 Reaction condition
<i>nifH</i>	<i>nifH</i> -F: TGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCATAGATSGCCATCATYTCRCCGGA	95℃ 5 min, 35×(95℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 45 s), 72℃ 6 min
	<i>nifH</i> -R: CCTACACGACGCTCTTCCGATCTCGGACTGATGCGAYCCSAARGCBGACTC	



不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。下同
Different lowercase letters indicate significant differences among treatments($P<0.05$). The same below

图2 纳米银暴露下土壤微生物OTU数量分布图及OTU的Venn图分析

Figure 2 Quantitative distribution of soil microbial OTU and Venn diagram representation of the OTU under the exposure of AgNP

分支,其中CK组独为一类,将nAg50S组和nAg50L组先归并,再与nAg10L组聚合为另一类,继而又与nAg10S组归并。CK组土壤样品微生物群落结构与nAg10S、nAg10L、nAg50S和nAg50L组差异较大。另外,从图中可以看到,CK组土壤相对丰度最高的菌属依次为慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、假单胞菌属

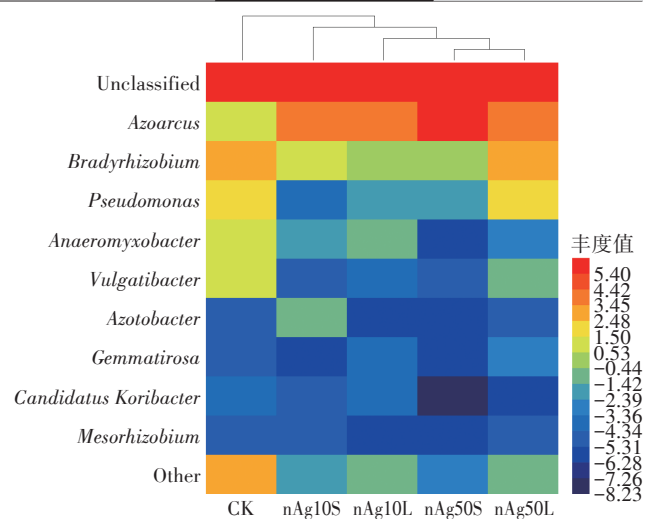


图3 纳米银暴露下土壤固氮微生物物种丰度热图

Figure 3 Heat map of soil nitrogen fixing microbial species abundance under the exposure of AgNP

(*Pseudomonas*)、流行杆菌属(*Vulgatibacter*)和厌氧黏细菌属(*Anaeromyxobacter*)。AgNP暴露后这些微生物的丰度明显降低,而固氮弧菌属(*Azoarcus*)的丰度却大幅上升,与CK组差别较大,说明AgNP的暴露引起了固氮微生物群落结构的改变。

2.3 AgNP暴露下土壤固氮微生物多样性分析

纳米银对土壤固氮微生物多样性的影响见表3。Chao指数和Ace指数常用来分析微生物群落的丰富程度。Shannon指数和Simpson指数用来估算样品中微生物的多样性,其中Shannon值越大,说明这个群落的多样性越高,而Simpson值则相反。Coverage指标本库的覆盖水平^[12]。从表3中可以发现,CK组的土壤固氮微生物的多样性最高,其次是nAg50L组和nAg10L组,nAg10S组的土壤固氮微生物多样性最低,这与各处理的OTU数目比较分析结果相似,说明AgNP改变了土壤固氮微生物群落,造成其多样性下降。

表3 纳米银对土壤固氮微生物多样性的影响

Table 3 Effects of AgNP on nitrogen-fixing microbial community diversity

处理 Treatments	覆盖率 Coverage/%	丰富度指数 Richness indexes		多样性指数 Diversity indexes	
		Chao1	Ace	Simpson	Shannon
CK	98.07±1.50a	3375±315a	3492±404b	0.005 3±0c	6.57±0.07a
nAg10S	97.37±0.60a	3005±462a	3629±210b	0.057 0±0.002a	4.61±0.10d
nAg10L	96.82±0.68a	3035±377a	3467±239b	0.018 1±0.007b	5.54±0.33b
nAg50S	96.45±0.47a	3719±351a	4463±445a	0.029 6±0.005b	5.00±0.08c
nAg50L	96.22±0.70a	3666±47a	3983±137ab	0.024 7±0.003b	5.85±0.63b

注:表中同列不同小写字母表示各处理间差异显著($P<0.05$)。
Note: Different lowercase letters within a column indicate significant difference at $P<0.05$.

2.4 AgNP对土壤自生固氮菌数量的影响

两种粒径的AgNP暴露下土壤自生固氮菌数量变化如图4所示。nAg10(10、25、50 mg·kg⁻¹)暴露28 d后,土壤自生固氮菌数量减少了18.96%~47.28%;nAg50(25、50、100 mg·kg⁻¹)暴露28 d后土壤自生固氮菌数量减少了17.42%~27.78%;两种粒径AgNP暴露90 d后,土壤自生固氮菌数量总体上分别下降了29.51%~51.04%和20.83%~24.47%。随着暴露时间的延长,AgNP对土壤自生固氮菌数量影响减轻,且nAg10对土壤固氮菌表现出更强的抗菌活性,说明AgNP对自生固氮菌的影响与其暴露时间和尺寸有关。

2.5 AgNP对土壤固氮酶活性的影响

从图5可以看出,CK组土壤固氮酶活性最高,AgNP暴露下土壤固氮酶活性均受到不同程度的影响,尤其是培养后期,土壤固氮酶活性明显降低。nAg10(50 mg·kg⁻¹)和nAg50(100 mg·kg⁻¹)暴露28 d后土壤固氮酶活性分别降低8.54%和6.76%。随着AgNP暴露时间的延长,土壤固氮酶活性继续降低。

第90 d时,与CK组相比,nAg10(10、25、50 mg·kg⁻¹)处理组土壤固氮酶活性下降了14.55%~27.47%,nAg50(25、50、100 mg·kg⁻¹)处理组土壤固氮酶活性降低了17.87%~21.79%。

3 讨论

土壤微生物在维持土壤功能方面发挥着重要作用,如分解有机物和将无机氮转化为有机氮等^[29]。自然生态系统和传统农业生产中的氮循环主要依赖于固氮微生物的生物固氮作用,因此确定AgNP对土壤微生物及其功能的影响尤为重要。本研究基于固氮微生物功能基因*nifH*的高通量测序分析结果,表明AgNP暴露导致土壤固氮微生物数量和OTU数量降低,改变固氮微生物的群落结构。没有添加AgNP的土壤中*Bradyrhizobium*为优势菌属,其相对丰度也较高。而AgNP暴露后*Azoarcus*变为优势菌属,且其相对丰度明显高于其他菌群。Chunjaturas等^[30]也发现AgNP暴露会改变土壤微生物群落组成。Ge等^[31]同样

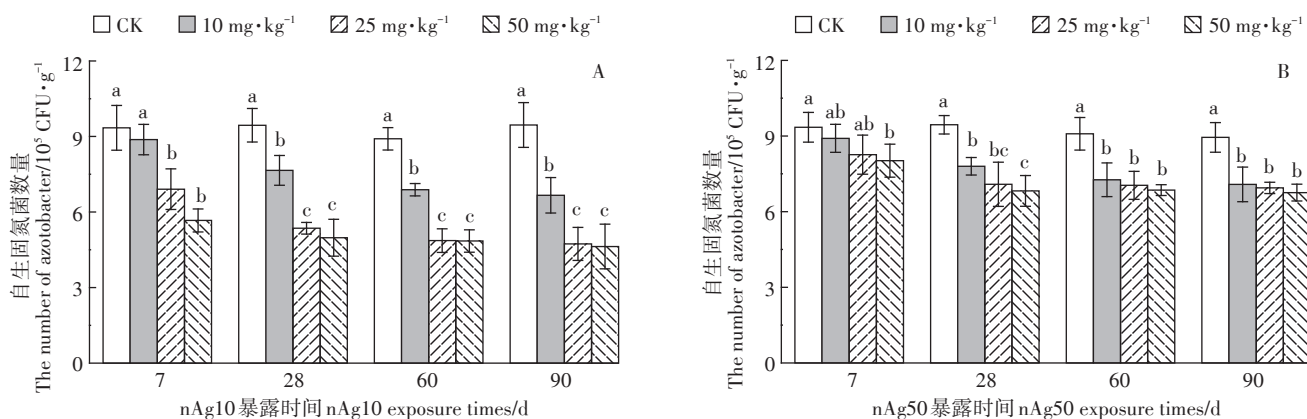


图4 两种粒径纳米银暴露下土壤自生固氮菌数量

Figure 4 Variation of azotobacter number under two sizes of AgNP exposure

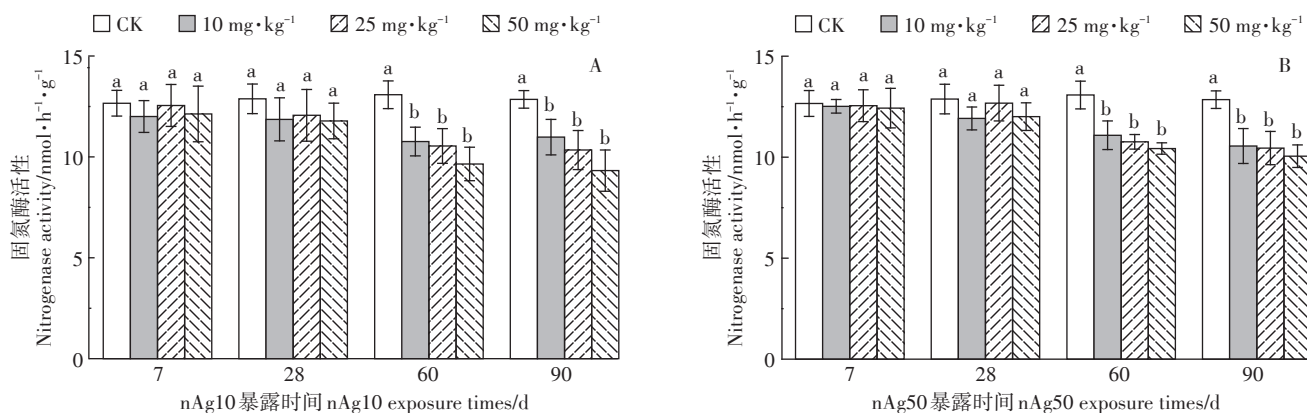


图5 两种粒径纳米银暴露下土壤固氮酶活性变化

Figure 5 Variation of soil nitrogenase activities under two sizes of AgNP exposure

发现不同剂量纳米二氧化钛(TiO_2NP)和纳米氧化锌(ZnONP)暴露均改变了土壤微生物群落构成,且群落多样性及土壤中微生物数量均减少。

固氮细菌对环境因素变化极其敏感,在两种粒径AgNP短期暴露下土壤自生固氮菌数量下降非常明显。另外,随着AgNP暴露时间的延长,各处理组自生固氮菌数量下降趋势变缓。出现这种现象可能是由于AgNP添加到土壤后,随着其暴露时间的延长,激发了微生物体内的自我保护机制,如产生细胞胞外蛋白质或多糖等物质来缓解AgNP的毒性;另外也可能是AgNP进入土壤后与有机物、黏土矿物等物质相互作用,使得AgNP发生团聚现象且释放的 Ag^+ 减少,影响了其毒性^[32]。除此之外,由于土壤氧化还原电位等因素还会促使一部分AgNP颗粒形成银的硫化物^[33],使其毒性降低。也有研究表明,土壤中AgNP转化的 Ag_2S 具有生物可利用性,能在不同的生物体中引起毒性效应^[34]。

乙炔还原试验结果表明AgNP抑制土壤固氮酶活性,但主要发生在AgNP的暴露后期,这可能是因为土壤固氮作用是一个缓慢的过程^[35]。Grün等^[32]研究发现,0.01~1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ AgNP暴露一年后对土壤微生物量、固氮微生物丰度、酶活性和功能基因表达具有负面作用,影响土壤氮循环。孙影等^[36]研究了不同剂量 TiO_2NP 暴露下对不同类型土壤中氮转化相关细菌活性的影响,发现其抑制了土壤自生固氮菌的活性。本研究发现AgNP造成土壤固氮作用下降,这一方面可能由于AgNP释放的 Ag^+ 的作用,另一方面可能是因为AgNP自身影响了土壤中的固氮微生物活性从而影响固氮作用。AgNP进入土壤后会释放出一定量的 Ag^+ , Ag^+ 与土壤微生物作用而影响酶的活性^[37]。同剂量AgNP和 Ag^+ 处理下,AgNP对土壤硝化作用的抑制效果更显著^[23]。另外, Ag^+ 对土壤微生物及酶活性在短期内作用效果明显,而AgNP对土壤微生物的毒性发生在暴露后期,其毒性更具持久性^[38],AgNP的毒性部分来自释放的 Ag^+ ,部分由于本身的特异抗菌性。前期实验室模拟培养条件下发现小粒径的AgNP对固氮菌具有更强的抑制作用^[39],但在土壤环境中两种粒径AgNP对土壤固氮微生物的毒性无显著差异,这可能是由于土壤系统比实验室模拟环境复杂,其缓冲作用较强。

虽然本研究发现AgNP暴露下土壤固氮微生物的种类减少,多样性及丰度降低,群落组成发生明显变化,土壤自生固氮菌数量和土壤固氮酶活性在Ag-

NP暴露后均受到不同程度的影响,对AgNP的土壤环境风险评价具有一定的贡献。但是关于AgNP对土壤固氮微生物代谢途径的影响以及与固氮酶的结合方式等尚不清楚,还有待进一步的研究。

4 结论

(1)AgNP作用下土壤固氮微生物多样性明显降低,其群落结构组成也发生显著变化。与对照组相比,50 nm的AgNP暴露90 d土壤固氮微生物群落结构差别最小,10 nm的AgNP暴露7 d土壤固氮微生物群落变化最大。

(2)两种粒径AgNP暴露后土壤自生固氮菌数量均下降,但随着AgNP暴露时间的延长,下降趋势变缓。

(3)土壤固氮酶活性随着AgNP暴露时间的延长而降低,AgNP暴露后期对土壤固氮酶活性影响较大。AgNP的抑制作用与其粒径、浓度以及暴露时间有关。

参考文献:

- [1] Reidy B, Haase A, Luch A, et al. Mechanisms of silver nanoparticle release, transformation and toxicity: A critical review of current knowledge and recommendations for future studies and applications[J]. *Materials*, 2013, 6(6):2295-2350.
- [2] Kora A J, Rastogi L. Enhancement of antibacterial activity of capped silver nanoparticles in combination with antibiotics, on model gram-negative and gram-positive bacteria[J]. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2013(8):871097.
- [3] Piccinno F, Gottschalk F, Seeger S, et al. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world [J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 2012, 14(9):1109-1120.
- [4] Sun T Y, Gottschalk F, Hungerbühler K, et al. Comprehensive probabilistic modelling of environmental emissions of engineered nanomaterials[J]. *Environmental Pollution*, 2014, 185(4):69-76.
- [5] Mueller N C, Nowack B. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment[J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(12):4447-4453.
- [6] Durán N, Durán M, De Jesus M B, et al. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity[J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2015, 12(3):789-799.
- [7] Beddow J, Stolpe B, Cole P, et al. Effects of engineered silver nanoparticles on the growth and activity of ecologically important microbes[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2014, 6(5):448-458.
- [8] Samarajeewa A D, Velicogna J R, Princz J I, et al. Effect of silver nanoparticles on soil microbial growth, activity and community diversity in a sandy loam soil[J]. *Environmental Pollution*, 2017, 220:504-513.
- [9] Liu F F, Fan J, Du J, et al. Intensified nitrogen transformation in intermittently aerated constructed wetlands: Removal pathways and microbial response mechanism[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 650:2880-2887.
- [10] Saenger A, Geisseler D, Ludwig B. C and N dynamics of a range of

- biogas slurries as a function of application rate and soil texture: A laboratory experiment[J]. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 2014, 60(12):1779-1794.
- [11] Galloway J N, Dentener F J, Capone D G, et al. Nitrogen cycles: Past, present, and future[J]. *Biogeochemistry*, 2004, 70(2):153-226.
- [12] Wang C, Jiang K, Zhou J, et al. *Solidago canadensis* invasion affects soil N-fixing bacterial communities in heterogeneous landscapes in urban ecosystems in east China[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 631:702-713.
- [13] Gupta V V S R, Roper M M, Roget D K. Potential for non-symbiotic N₂-fixation in different agroecological zones of southern Australia[J]. *Australian Journal of Soil Research*, 2006, 44(4):343-354.
- [14] Du P, Wu X, Xu J, et al. Clomazone influence soil microbial community and soil nitrogen cycling[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 644:475-485.
- [15] Collavino M M, Tripp H J, Frank I E, et al. *nifH* pyrosequencing reveals the potential for location-specific soil chemistry to influence N₂-fixing community dynamics[J]. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(10):3211-3223.
- [16] Dasgupta N, Ramalingam C. Silver nanoparticle antimicrobial activity explained by membrane rupture and reactive oxygen generation[J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2016, 14(4):477-485.
- [17] Tian X, Jiang X, Welch C, et al. Bactericidal effects of silver nanoparticles on *Lactobacilli* and the underlying mechanism[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(10):8443-8450.
- [18] Zhai Z M, Nie M Y, Guan Y, et al. A microfluidic surface-enhanced Raman spectroscopy approach for assessing the particle number effect of AgNPs on cytotoxicity[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 162:529-535.
- [19] Choi O, Clevenger T E, Deng B, et al. Role of sulfide and ligand strength in controlling nanosilver toxicity[J]. *Water Research*, 2009, 43(7):1879-1886.
- [20] 伍玲丽, 张旭, 舒昆慧, 等. 纳米银和银离子对土壤中硝化微生物及其氨氧化速率的影响[J]. *环境科学*, 2019, 40(6):2939-2947. WU Ling-li, ZHANG Xu, SHU Kun-hui, et al. Effects of silver nanoparticles and silver ions on soil nitrification microorganisms and ammonification[J]. *Environmental Sciences*, 2019, 40(6):2939-2947.
- [21] Masrahi A, Vandevoort A R, Arai Y. Effects of silver nanoparticle on soil-nitrification processes[J]. *Archives of Environmental Contamination & Toxicology*, 2014, 66(4):504-513.
- [22] Li D, Wang Z, Sun X, et al. Tree species effects on asymbiotic N₂ fixation in subtropical karst and non-karst forests[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2018, 117:185-190.
- [23] 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.
- [24] Arnaout C L, Gunsch C K. Impacts of silver nanoparticle coating on the nitrification potential of *Nitrosomonas europaea*[J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(10):5387-5395.
- [25] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000. BAO Shi-dan. Soil agrochemical analysis[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2000.
- [26] Huang J, Cao C, Yan C, et al. Impacts of silver nanoparticles on the nutrient removal and functional bacterial community in vertical subsurface flow constructed wetlands[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 243:1216-1226.
- [27] 李振高, 骆永明, 藤应. 土壤与环境微生物研究方法[M]. 北京: 科学出版社, 2008. LI Zhen-gao, LUO Yong-ming, TENG Ying. Research methods of soil and environmental microorganisms[M]. Beijing: Science Press, 2008.
- [28] Wang Q, Wang J, Li Y, et al. Influence of nitrogen and phosphorus additions on N₂-fixation activity, abundance, and composition of diazotrophic communities in a Chinese fir plantation[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 619/620:1530-1537.
- [29] Lupwayi N Z, Brandt S A, Harker K N, et al. Contrasting soil microbial responses to fertilizers and herbicides in a canola-barley rotation[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2010, 42(11):1997-2004.
- [30] Chunjaturas W, Ferguson J A, Rattanapichai W, et al. Shift of bacterial community structure in two Thai soil series affected by silver nanoparticles using ARISA[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2014, 30(7):2119-2124.
- [31] Ge Y, Schimel J P, Holden P A. Evidence for negative effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles on soil bacterial communities[J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(4):1659-1664.
- [32] Grün, A L, Straskraba S, Schulz S, et al. Long-term effects of environmentally relevant concentrations of silver nanoparticles on microbial biomass, enzyme activity, and functional genes involved in the nitrogen cycle of loamy soil[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2018, 69:12-22.
- [33] Schultz C L, Gray J, Verweij R A, et al. Aging reduces the toxicity of pristine but not sulphidised silver nanoparticles to soil bacteria[J]. *Environmental Science: Nano*, 2018, 5(11):2618-2630.
- [34] Kraas M, Schlich K, Knopf B, et al. Long-term effects of sulfidized silver nanoparticles in sewage sludge on soil microflora[J]. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 2017, 36(12):3305-3313.
- [35] Patra A K, Abbadie L, Clays-Josserand A, et al. Effects of management regime and plant species on the enzyme activity and genetic structure of N-fixing, denitrifying and nitrifying bacterial communities in grassland soils[J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(6):1005-1016.
- [36] 孙影, 李琳慧, 郭平. 纳米TiO₂对土壤中氮转化相关细菌活性的影响[J]. *科学技术与工程*, 2016, 16(20):295-300. SUN Ying, LI Lin-hui, GUO Ping. Effect of nano-TiO₂ on bacteria activity for nitrogen transform in soil[J]. *Science Technology and Engineering*, 2016, 16(20):295-300.
- [37] 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.
- [38] 舒昆慧, 张丽, 伍玲丽, 等. 纳米银与银离子对土壤微生物及酶活性的影响[J]. *生态毒理学报*, 2019, 14(2):242-250. SHU Kun-hui, ZHANG Li, WU Ling-li, et al. Effects of silver nanoparticles and silver ions on soil microorganisms and enzyme activities[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2019, 14(2):242-250.
- [39] Zhang L, Wu L L, Si Y B, et al. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles to *Azotobacter vinelandii*: Growth inhibition, cell injury, oxidative stress and internalization[J]. *PLoS One*, 2018, 13(12):e0209020.