

石墨烯施用后对土壤酶活性及土壤微生物群落的影响^①

李丽娜^{1,2}, 滕应^{1*}, 任文杰¹, 李振高¹, 骆永明¹

(1 中国科学院土壤环境与污染修复重点实验室(南京土壤研究所), 南京 210008; 2 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 将不同浓度的纯石墨烯和氧化石墨烯(0、100、1 000 mg/kg)分别加入潮土和红壤两种土壤中, 培养 56 天后测定潮土和红壤中的脲酶、过氧化氢酶活性, 微生物功能及遗传多样性变化。结果表明, 培养 0、7、14、56 天后, 100 和 1 000 mg/kg 浓度的石墨烯和氧化石墨烯对红壤和潮土的脲酶和过氧化氢酶活性没有显著的影响。两种浓度的石墨烯和氧化石墨烯对红壤和潮土微生物的 AWCD 指数没有显著的影响, 且两种土壤之间未表现出差异。对添加 0、200 和 1 000 mg/kg 氧化石墨烯的潮土进行 DGGE 测试分析, 处理组与对照组相比增加了 3 个条带, 测序分析认为这 3 个条带与鞘氨醇单细胞菌属和未被培养的细菌类似, 可见氧化石墨烯对土壤中微生物有一定的影响, 能引起耐受菌数量的增加。

关键词: 石墨烯; 土壤酶活性; 微生物群落

中图分类号:

石墨烯(Graphene)是碳原子以 sp^2 杂化轨道构成的层状二维纳米材料^[1], 是构建富勒烯、碳纳米管、石墨的基本结构单元。石墨烯具有独特的物理、化学性质, 如巨大的比表面积、优良的导电性能和机械强度^[1]、良好的导热性以及独特的光学性能^[2-3], 这些性质使得石墨烯在能源、材料^[4]、电力^[5]、生物制药^[6-8]和污染修复^[9]等领域表现出了巨大的应用潜力。随着制备方法的不断成熟, 石墨烯已经逐步转入工业化生产。目前, 我国在常州已建立石墨烯产业基地。到 2016 年, 常州的石墨烯产量将会达到 1 000 t。据估计到 2020 年, 石墨烯的产值将超过 60 亿^[10]。随着生产应用的不断增加, 石墨烯将会大量地进入土壤环境中^[5-6], 与土壤成分发生作用, 对土壤的物化性质产生影响^[11]。因此在大规模使用前, 有必要对石墨烯的土壤环境影响进行研究。

土壤微生物群落变化是深入了解石墨烯土壤环境影响的一个有效指标。据报道石墨烯对植物、动物、微生物的生理代谢具有一定的毒性作用^[12-17]。在纯培养条件下石墨烯能够抑制细菌生长。石墨烯与革兰氏阴性菌——大肠杆菌和革兰氏阳性菌——金黄葡萄球菌接触后, 能造成细菌的细胞损伤, 同时还会影响细菌细胞的电子传递^[17]。石墨烯和氧化石墨烯的

悬浮液能够抑制大肠杆菌的生长, 石墨烯制成的薄膜也能抑制大肠杆菌的活性^[10]。石墨烯对废水中的微生物具有毒性剂量效应, 并且浓度在 50 到 300 mg/L 范围内毒性作用最强。石墨烯引起生物体内产生大量的活性氧离子被认为是影响微生物生长的主要机制^[10]。但是目前关于石墨烯进入土壤环境后对微生物群落的影响研究很少。因此, 本文通过土壤酶活性分析及 Biolog 微平板法和基于土壤 DNA 提取的分子生物学技术^[18-20], 探究纯石墨烯和氧化石墨烯对土壤中微生物群落结构的影响, 为石墨烯污染土壤生态风险评估提供基本依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试土壤 供试土壤为红壤和潮土, 分别来自江西鹰潭市和河南封丘县的农田土壤。将以上两种土壤剔除植物残根等杂物后, 过 100 目筛, 置于 4 条件下保存备用。试验开始前需在室温条件下放置 72 h。供试土壤理化性质见表 1。

1.1.2 药品与试剂 纯石墨烯和氧化石墨烯(纯度 >99%)购自南京先锋有限公司, 单层石墨烯和单层氧化石墨烯的片层厚度为 0.8 ~ 1.2 nm。纳米材料的尺寸

基金项目: 国家自然科学基金项目(41230858, 41371309)资助。

* 通讯作者(yteng@issas.ac.cn)

作者简介: 李丽娜(1989—), 女, 云南弥渡人, 硕士研究生, 主要从事土壤污染修复方面的研究。E-mail: lnli@issas.ac.cn

是决定纳米材料毒性的重要因素^[21]。所以在试验前对石墨烯和氧化石墨烯进行了表征。石墨烯和氧化石墨

烯的扫描电镜图片由南京先锋有限公司提供(图 1)。目前仍没有标准的方法表征石墨烯在土壤中的分布。

表 1 供试土壤的基本理化性质
Table 1 Physico-chemical properties of soil tested

土壤类型	pH	有机质 (g/kg)	全氮 (g/kg)	速效磷 (mg/kg)	速效钾 (mg/kg)	阳离子交换量 (cmol/kg)
红壤	4.72	3.76	0.35	0.83	48	7.64
潮土	7.35	8.25	0.89	9.21	60	17.63

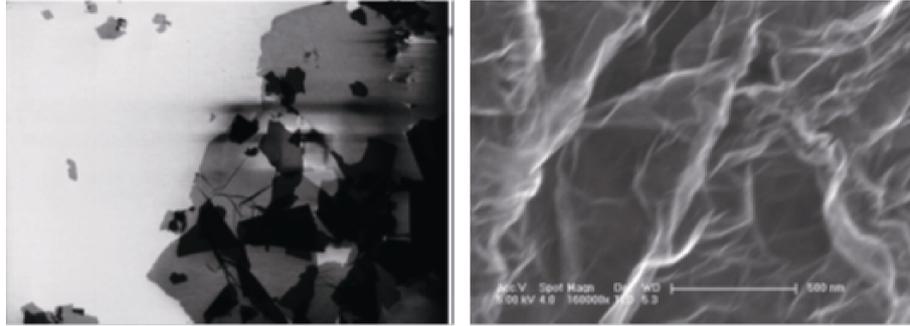


图 1 氧化石墨烯和石墨烯的扫描电镜图片
Fig. 1 SEM images of graphene and graphene oxide

1.2 土壤处理

称取相当于 2 kg 干重的新鲜土壤置于玻璃盒中,加入干燥的石墨烯和氧化石墨烯粉末,使土壤中石墨烯和氧化石墨烯的浓度达到 100 mg/kg 与 1 000 mg/kg。调节含水量至土壤最大持水量的 60%,置于 28℃ 恒温恒湿的培养箱中避光培养。因为石墨烯不能分散在水中,同时也为了更好地模拟固体石墨烯和氧化石墨烯进入土壤的状态,所以在本试验中以固体粉末的形式加入土壤。高浓度 1 000 mg/kg 的氧化石墨烯和石墨烯需要以低剂量多次添加,以便在土壤中均匀分布^[22-23]。

1.3 土壤酶活性的测定

土壤过氧化氢酶的测定:称取 5 g 过 2 mm 筛的新鲜土样置于三角瓶,加入 40 ml 蒸馏水和 5 ml 0.3% 过氧化氢。在 120 r/min 摇床上振荡 30 min,加入 5 ml 1.5 mol/L 硫酸终止反应,过滤,取滤液 25 ml,用 0.002 mol/L 高锰酸钾溶液滴定至微红色。

土壤脲酶活性测定:称取 5 g 过 2 mm 筛的新鲜土样置于 50 ml 容量瓶,加入 1 ml 甲苯使土壤全部湿润。培养 15 min 后加入 10 ml 10% 尿素溶液和 20 ml 柠檬酸盐缓冲溶液(pH 6.7)充分混合后在 37℃ 恒温箱培养 24 h。用 37 蒸馏水稀释至刻度过滤,取滤液 1 ml 置于 50 ml 容量瓶中,加入 9 ml 蒸馏水充分混匀,再加入 4 ml 苯酚钠和 3 ml 次氯酸钠溶液。混合后静置 20 min 蒸馏水定容,在 578 nm 条件下比色

测定溶液中铵态氮的含量。

1.4 土壤微生物群落功能多样性的测定

土壤微生物群落功能多样性采用含 31 种碳源的 Biolog-ECO 方法测试^[17]。试验前,将

Biolog-ECO 微平板从 4 冷库中取出,在 25℃ 条件下活化 30 min。称取相当于 10 g 干土的新鲜土于三角瓶中,加入灭菌的 0.85% NaCl 溶液,250 r/min 振荡 10 min 后,按照逐级稀释法将土壤悬液浓度稀释至 10^{-3} ,取 150 μ l 土壤悬液接种到 Biolog-ECO 微平板孔中,每个土壤样品 3 次重复。25℃ 条件下培养 168 h,每隔 12 h 在酶标仪上(μ quant, BioTek 公司)读取 590 nm 处的吸光值。计算平均每孔颜色变化率(average well color development, AWCD)来描述土壤微生物的代谢活性。

1.5 土壤微生物遗传多样性的分析

采用 MPBIO 公司 Fast DNA SPIN Kit for Soil 试剂盒提取添加氧化石墨烯培养 56 天的潮土 DNA。对提取的 DNA 采用含 GC-clamp 的 515F 和 907R 引物进行扩增。引物序列分别为 CGCCCGCCGCGCG CGGCGGGCGGGGCGGGGACGCGGGGGGTGCC AGCMGCCGCGG 和 CCGTCAATTCMTTTR AGTTT。加入 150 ng 扩增后的 PCR 产物于 DGGE 系统(C.B.S. Scientific Company Inc, USA)中。45%~80% 的变性梯度范围,8% 聚丙烯酰胺凝胶浓度,60℃ 0.5 \times TAE 缓冲液中 80 V 电压下电泳 16 h。使用 SYBR Green I

核酸染料(Generay TM Biotechnology)黑暗条件下染色 30 min, 在凝胶成像系统(Bio-Rad)中查看结果并切胶。采用无 GC-clamp 的引物 515F 和 907R 进行 PCR 扩增, 用 pEASY Cloning KitT3(TransGen Biotech)试剂盒进行克隆实验。并随机挑选阳性克隆委托金斯瑞生物公司进行测序。在 NCBI 提供的 BLAST 中对序列进行同源性比对。

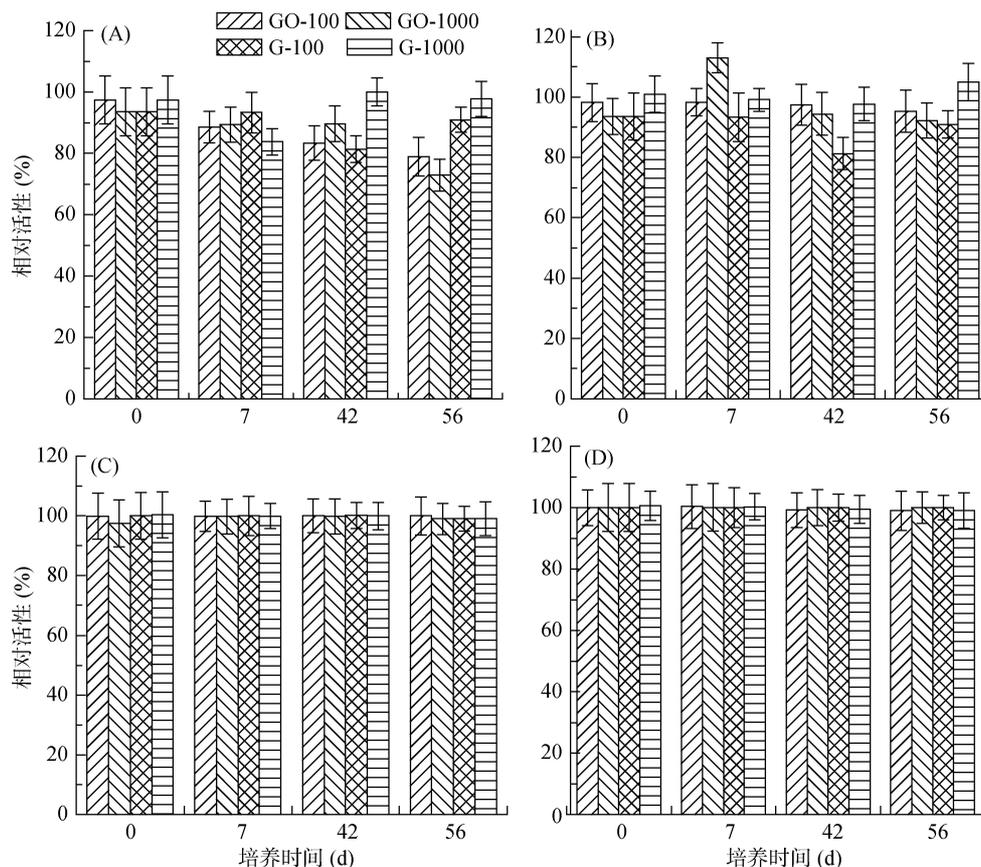
2 结果与讨论

2.1 石墨烯和氧化石墨烯对土壤酶活性的影响

土壤酶活性是评价污染物或者其他外来物质对土壤生物活性影响的重要指标之一。如图 2 所示, 添加 100 mg/kg 和 1 000 mg/kg 的石墨烯和氧化石墨烯

到红壤和潮土中后过氧化氢酶和脲酶的活性在 0、7、42、56 天与对照相比没有显著的差异。虽然潮土微生物活性整体比红壤高, 但是石墨烯和氧化石墨烯添加后对潮土的活性也没有显著的影响。

碳纳米材料对土壤酶活性影响研究相对比较匮乏, 主要集中在碳纳米管和富勒烯^[24]。鉴于石墨烯与富勒烯、碳纳米管的相似性质, 我们将其结果与其他两种相比较。本文的研究结果与他人研究结果是相一致的。经过 6 个月的 1 000 mg/kg 的富勒烯处理后, 土壤的过氧化氢酶、磷酸酶、-葡萄糖苷酶和 -葡萄糖苷酶活性没有发生明显的变化^[20]。同样经过 3 个月同样浓度的多壁碳纳米管处理, 土壤的过氧化氢酶、葡萄糖苷酶和磷酸酶活性与对照相比没有显著的差异^[24-25]。



(GO-100、GO-1000 表示添加 100 mg/kg 和 1 000 mg/kg 的氧化石墨烯, G-100、G-1000 表示添加 100 mg/kg 和 1 000 mg/kg 的石墨烯)

图 2 潮土脲酶(A)、红壤脲酶(B)、潮土过氧化氢酶(C)、红壤过氧化氢酶(D)相对于对照的活性变化

Fig. 2 Relative activities of ureases and catalases in Fluvo-aquic soil and red soil treated with graphene and graphene oxide compared with soil controls

脲酶能够专一性地促进尿素水解成氨和碳酸, 是微生物氮源的重要来源^[26-27]。本文的研究表明石墨烯和氧化石墨烯对土壤氮素的循环没有显著的影响。土壤过氧化氢酶活性变化被广泛地用作重金属和抗菌剂毒性的标志^[24], 石墨烯对土壤中的过氧化氢酶活性没有影响(图 2), 表明石墨烯的土壤毒性是有限的。虽然

Ahmed 等^[10]研究表明当氧化石墨烯直接与过氧化氢酶接触时会引起酶结构和性质的改变, 同时氧化石墨烯能够抑制过氧化氢酶的活性, 但是本研究结果显示将氧化石墨烯加入土壤以后, 过氧化氢酶的活性与对照相比没有发生明显的变化。这可能由两方面原因造成: 一方面碳纳米材料对细菌的毒性随着分散性和接触时间的增

加而增加^[6]。本研究将石墨烯加入土壤以后,石墨烯与过氧化氢酶接触有限,虽然有研究表明部分石墨烯能够进入生物体内^[16],但是由于石墨烯容易与土壤中的有机质等发生作用,使石墨烯进入生物体内的概率比较低。同时试验过程中土壤仅培养了 56 天,短时间内石墨烯类材料可能并没有表现出它的毒性^[24]。另外活性氧离子的产生被认为是石墨烯类物质对细菌 DNA、蛋白质和细胞膜毒性的主要机制,石墨烯和氧化石墨烯进入土壤后,可能并没有像在污水里面一样能引起活性氧离子的增加^[10],从而使土壤酶活性发生变化。

2.2 石墨烯和氧化石墨烯对土壤微生物功能多样性的影响

石墨烯和氧化石墨烯施用于红壤和潮土后对土

壤微生物群落多样性指数的影响如图 3 所示。AWCD 值在 12 h 后开始上升,到达第 96 h 以后基本趋于稳定,这一变化趋势与他人研究结果是相一致的,微生物经过培养以后活性逐渐增加^[28-29]。加入 100 mg/kg 和 1 000 mg/kg 石墨烯和氧化石墨烯的两组土壤分别与对照组土壤相比,微生物群落 AWCD 值并无显著性差异。土壤微生物群落多样性反映了群落整体的动态变化,而研究土壤微生物对不同碳源利用能力的差异则可以深入地了解微生物群落的结构组成。铜、石油等物质进入土壤后可以改变土壤微生物对碳源的利用^[31],但是石墨烯和氧化石墨烯加入土壤以后对土壤微生物碳源利用未造成影响,说明石墨烯和氧化石墨烯对微生物功能多样性影响是有限的。

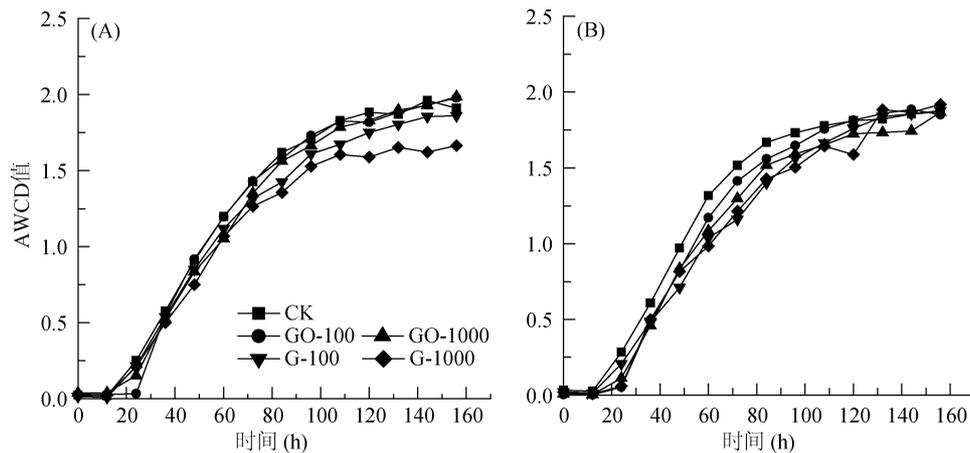


图 3 培养 56 天后潮土和红壤各处理 AWCD 值随时间的变化(A. 潮土、B. 红壤)

Fig. 3 Variations of average well color development (AWCD) in two soil types treated with graphene and graphene oxide

虽然 Akhavan 和 Ghaderi^[17]研究结果表明在纯培养的条件下两种类型石墨烯与细菌表面接触,通过损伤细菌的细胞膜造成细菌成活率降低,但本研究中,加入土壤中的石墨烯并没有引起土壤微生物的 AWCD 指数的变化。此结果与之前 Tong 等^[18]和 Shrestha 等^[24]的研究结果相一致,10、100 和 1 000 mg/kg 的富勒烯和多壁碳纳米管对土壤微生物的群落没有显著的影响。而 Jin 等^[30]的研究发现革兰氏阳性和革兰氏阴性菌的生物量与单壁纳米管的含量呈负相关。通过比较 Shrestha 和 Jin 的研究结果发现多壁纳米管和单壁纳米管对土壤微生物具有不同的作用效果,说明了纳米材料尺寸影响其毒性的。此次研究未探讨不同尺寸石墨烯对土壤微生物群落结构的影响,但是使用了两种类型的石墨烯:纯石墨烯和氧化石墨烯。虽然两种材料的结构不相同,物化性质有差异,但是这两种物质的片层厚度是一样的,两种物质的试验结果没有显著差异,这也说明纳米尺寸可能对纳米材料的毒性起到了一定的作用。

2.3 石墨烯和氧化石墨烯对土壤微生物遗传多样性的影响

采用 PCR-DGGE 方法研究了潮土中细菌群落结构的变化,16S rRNA 基因片段的指纹图谱显示,添加氧化石墨烯土壤与对照土壤相比多了 1、2、3 三个条带。通过对测序结果构建系统发育树(图 4)可以看出处理组所增加的电泳条带与鞘胺醇单细胞菌属和未被培养的细菌具有很高的相似性(>99%)。

氧化石墨烯对土壤微生物群落的遗传多样性的影响是有限的,这与 AWCD 指数变化一致。DGGE 是一种对土壤中化学物质作用进行评价的有效方法^[19]。尽管在该研究中,处理组土壤中加入的氧化石墨烯浓度达到了 1 000 mg/kg,但是处理组土壤中仅分离出 3 个有差异的条带,通过克隆检测这 3 个条带为鞘胺醇单胞菌属和未被培养的细菌。这说明氧化石墨烯的加入只引起了少部分的细菌发生变化,对土壤功能具有重要作用的绝大多数细菌没有产生影响。这个结果与 Tong 等^[18]研究是一致的。土壤中加入富勒烯后土壤

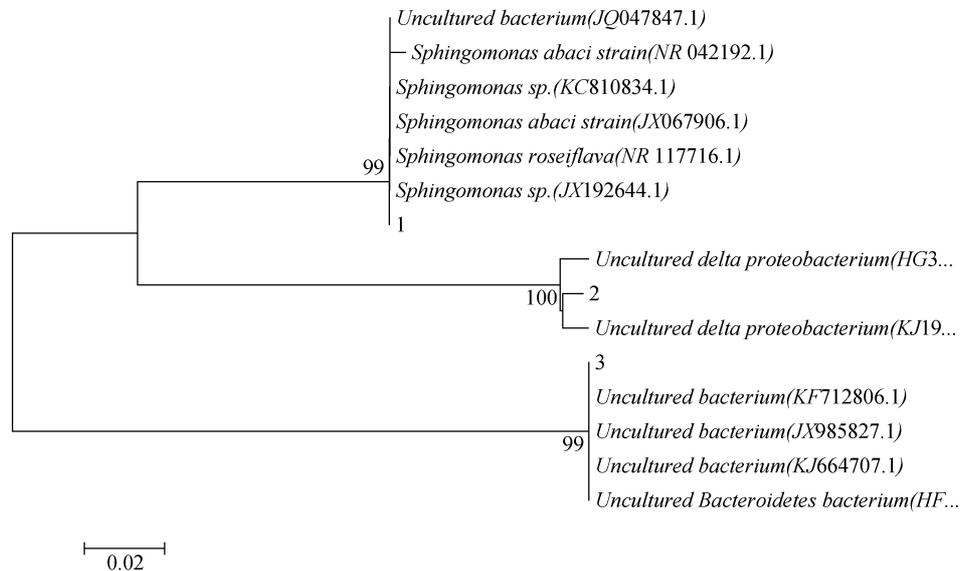


图 4 DGGE 条带的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of DGGE bands and their nearest neighbors in GenBank

中微生物的群落结构与对照相比未发生明显的变化。有研究发现当碳纳米管用量达到 10 000 mg/kg 时,多环芳烃降解菌等会发生增加,表明多壁纳米管能够引起土壤中耐受菌数量的增长^[24]。单壁碳纳米管能够引起与土壤营养物质循环相关细菌和真菌数量的减少^[30]。而在本研究中,氧化石墨烯也引起了多环芳烃降解菌数量增加,但未引起细菌数量的减少。据报道鞘氨醇单胞菌属细菌能够降解土壤中多环芳烃^[31],同时对重金属锌^[34]具有极强抗性。这说明氧化石墨烯对土壤环境造成了一定的影响,引起耐受菌的增加。

本研究结果显示石墨烯在短期内对红壤和潮土脲酶、过氧化氢酶活性、微生物群落多样性没有影响。造成这个差异的原因可能是施用石墨烯后,土壤中的无机盐离子、有机质和土壤胶体的存在影响了石墨烯的迁移转化,最终影响了石墨烯在土壤中的暴露浓度和毒性大小^[11,33]。Lanphere 等^[34]研究了离子强度对氧化石墨烯在饱和石英砂柱的迁移行为影响。当离子强度较高时,由于团聚和相互作用的增强,氧化石墨烯在饱和多孔介质中的迁移能力降低。因此土壤中存在的离子可能影响了石墨烯对土壤的毒性。研究表明石墨烯具有大的比表面积,这一特性使石墨烯容易与土壤有机质结合,并且吸附土壤里的有机物质,致使石墨烯在土壤中难以发生迁移。土壤中的胶体与石墨烯类物质相互作用,也会使石墨烯类物质发生团聚,从而减少石墨烯类物质对细菌的毒性^[14]。本研究选择有机质含量和阳离子交换量具有明显差异的两种土壤,我们假设石墨烯能够克服土壤中有有机质和离子的

影响,对土壤微生物的生长产生影响。但是即使石墨烯和氧化石墨烯浓度达到 1 000 mg/kg,两种土壤的微生物多样性没有发生显著的变化。所以有必要进一步开展更加严格的条件控制试验,找到影响土壤中石墨烯生物有效性的因素,以对其环境风险评估提供参考。

3 结论

石墨烯和氧化石墨烯对潮土和红壤脲酶和过氧化氢酶活性及微生物功能多样性没有显著的影响,氧化石墨烯能够引起鞘氨醇单胞菌属和未培养过的细菌增加。石墨烯进入土壤以后受到多种因素的影响,是其毒性作用受到限制的主要原因。本研究主要选择了潮土和红壤两种土壤,而且只培养了 56 天,石墨烯对其他土壤类型的作用以及在长时间培养下是否能对土壤生物活性产生影响,以及石墨烯的环境行为生物有效性、生物毒性机理等,还有待于进一步研究。

参考文献：

- [1] Geim A K. Graphene: Status and prospects[J]. Science, 2009, 324: 1 530
- [2] Geim A K, Novoselov K S. The rise of graphene[J]. Nature Materials, 2007, 6: 183-191
- [3] Li D, Müller M B, Gilje S, et al. Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets[J]. Nature Nanotechnology, 2008, 3: 101-105
- [4] Zhang L, Xia J, Zhao Q, et al. Functional graphene oxide as a nanocarrier for controlled loading and targeted delivery of mixed anticancer drugs[J]. Small, 2010, 6: 537-544

- [5] Paek S M, Yoo E, Honma I. Enhanced cyclic performance and lithium storage capacity of SnO₂/graphene nanoporous electrodes with three dimensionally delaminated flexible structure[J]. *Nano Letter*, 2009, 9: 72–75
- [6] Pan Y, Sahoo N G, Li L. The application of graphene oxide in drug delivery[J]. *Expert Opinion Drug Deliver*, 2012, 9: 1 365–1 376
- [7] Yang K, Li Y, Tan X, et al. Behavior and toxicity of graphene and its functionalized derivatives in biological systems[J]. *Small*, 2012, 9: 1 492–1 503
- [8] Srivastava G, Talat M, Raghubanshi H, et al. Cicer alphasgalactosidase immobilization onto functionalized graphene nanosheets using response surface method and its applications[J]. *Food Chemistry*, 2014, 142: 430–438
- [9] 庄媛, 于飞, 马杰, 等. 石墨烯去除水中重金属和抗生素的研究进展[J]. *功能材料*, 2014, 23: 23 001–23 009
- [10] Ahmed F, Rodrigues D F. Investigation of acute effects of graphene oxide on wastewater microbial community: A case study[J]. *Journal of Hazard Mater*, 2013, 256: 33–39
- [11] 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
- [12] 孙寒, 冯雷雨, 陈银广. 石墨烯健康风险研究现状及展望[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2015, 42(1): 5–15
- [13] 田甜, 吕敏, 田咏, 等. 石墨烯的生物安全性研究进展[J]. *科学通报*, 2014, 59(20): 1 927–1 936
- [14] Begum P, Ikhtiar R, Fugetsu B. Graphene phytotoxicity in the seedling stage of cabbage, tomato, red spinach, and lettuce[J]. *Carbon*, 2011, 49: 3 907–3 919
- [15] Zhang X, Yin J, Peng C, et al. Distribution and biocompatibility studies of graphene oxide in mice after intravenous administration[J]. *Carbon*, 2011, 49(3): 986–995
- [16] Lammel T, Boisseaux P, Fernández-Cruz M L, et al. Internalization and cytotoxicity of graphene oxide and carboxyl graphene nanoplatelets in the human hepatocellular carcinoma cell line Hep G2[J]. *Particle and Fibre Toxicology*, 2013, 10(1): 27
- [17] Akhavan O, Ghaderi E. Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria[J]. *ACS Nano*, 2010, 4(10): 5 731–5 736
- [18] Tong Z H, Bischoff M, Nies L, et al. Impact of Fullerene (C60) on a Soil Microbial Community[J]. *Environ. Sci. Technol.*, 2007, 41: 2 985–2 991
- [19] 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
- [20] 滕应, 骆永明, 李振高. 污染土壤的微生物多样性研究[J]. *土壤学报*, 2006, 43(6): 1 018–1 026
- [21] Kang S, Herzberg M, Rodrigues D F, et al. Antibacterial effects of carbon nanotubes: Size does matter[J]. *Langmuir*, 2008, 24: 6 409–6 413
- [22] Klaine S J, Alvarez P J, Batley G E, et al. Materials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects[J]. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2008, 27: 1 825–1 851
- [23] Stone V, Nowack B, Baun A, et al. Nano-materials for environmental studies: Classification, reference material issues and strategies for physico-chemical characterization[J]. *Sci. Total Environ.*, 2010, 408: 1 745–1 754
- [24] Shrestha B, Martinez V A, Cox S B, et al. An evaluation of the impact of multiwalled carbon nanotubes on Soil microbial community structure and functioning[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2013, 261: 188–197
- [25] 贺涔霖, 高飞, 卢晓霞, 等. 多壁碳纳米管对土壤微生物的生态毒理效应[J]. *生态毒理学报*, 2012, 7(2): 155–161
- [26] 付玲芳, 李妙玲, 秦华明, 等. 十溴联苯醚对两种土壤酶活性的影响[J]. *土壤*, 2014, 46(4): 689–696
- [27] 张池, 陈旭飞, 周波, 等. 蚓粪施用对土壤微生物特征以及酶活性的影响[J]. *土壤*, 2014, 46(1): 70–75
- [28] Wei X I, Ge Z Q. Effect of graphene oxide on conformation and activity of catalase[J]. *Carbon*, 2013, 60: 401–409
- [29] 郭星亮, 谷洁, 陈智学, 等. 铜川煤矿区重金属污染对土壤微生物群落代谢和酶活性的影响[J]. *应用生态学报*, 2012, 23(3): 798–806
- [30] Jin L X, Son Y H, DeForest J L, et al. Single-walled carbon nanotubes alter soil microbial community composition[J]. *Science of the Total Environment*, 2014, 466–467: 533–538
- [31] Tao X Q, Lu G N, Liu J P, et al. Rapid degradation of phenanthrene by using sphingomonas sp. GY2B immobilized in calcium alginate gel beads[J]. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2009, 6: 2 470–2 480
- [32] 王慧萍, 谢学辉, 柳建设. 抗锌细菌 *Sphingomonas* sp. DX-T3-03 分离、鉴定及性质[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(10): 1 495–1 500
- [33] 任文杰, 滕应. 石墨烯的环境行为及其对环境中污染物迁移归趋的影响[J]. *应用生态学报*, 2014, 25(9): 2 723–2 732
- [34] Lanphere J D, Luth C J, Walker S L. Effects of Solution Chemistry on the Transport of Graphene Oxide in Saturated Porous Media[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47 (9): 4 255–4 261

Effects of Graphene on Soil Enzyme Activities and Microbial Communities

LI Lina^{1,2}, TENG Ying^{1*}, REN Wenjie¹, LI Zhengao¹, LUO Yongming¹

(1 *Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China*; 2 *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

Abstract: In this study, soils were treated with 0, 100 and 1 000 g/kg pristine graphene and graphene oxide for up to 56 days, respectively. Treatment effects on urease and catalase activity, microbial communities were evaluated. Microbial community sizes were evaluated by using both Biolog-eco plate and DGGE method. The results showed that the introduction of graphene, as either pristine graphene or graphene oxide, had little impact on urease and catalase activities after cultivation for 0, 7, 14 and 56 days. AWCD values of red soil and fluvo-aquic soil treated with graphene and graphene oxides showed no differences as compared with control. Only DGGE results showed a little changes of bacterium genera in fluvo-aquic soil treated with graphene oxide.

Key words: Graphene; Soil enzyme activities; Microbial community