

徐坤, 张晓琳, 胡晗, 李守望, 鲁成秀, 成杰民. 改性纳米碳黑修复镉污染土壤对蚯蚓的毒理效应[J]. 应用与环境生物学报, 2020, 26 (3): 543-550
Xu K, Zhang XL, Hu H, Li SW, Lu CX, Cheng JM. Toxicological effects of modified nano-carbon black on earthworms in Cd-contaminated soil [J]. Chin J Appl Environ Biol, 2020, 26 (3): 543-550

改性纳米碳黑修复镉污染土壤对蚯蚓的毒理效应

徐坤 张晓琳 胡晗 李守望 鲁成秀 成杰民✉

山东师范大学地理与环境学院 济南 250014

摘要 为评估改性纳米碳黑(modified nano-carbon black, MCB)应用于镉(Cd)污染土壤修复对蚯蚓的毒理效应,通过土壤培养试验和体外毒性试验比较纳米碳黑(nano-carbon black, CB)与MCB、Cd与MCB + Cd/MCB-Cd处理对蚯蚓个体存活率、生理生化指标、体腔细胞存活率和DNA损伤的差异。结果显示:(1)CB本身对蚯蚓个体及体腔细胞毒性较小。(2)与CB相比,施加1.5% MCB显著促进了蚯蚓体内过氧化氢酶(CAT)活力,降低了还原型谷胱甘肽(GSH)和氧化型谷胱甘肽(GSSG)比值($P < 0.05$),且100 mg/L MCB悬浮液比CB悬浮液对体腔细胞的DNA损伤程度更大。(3)土壤Cd含量为5.31 mg/kg时对蚯蚓个体存活率和CAT活力无显著影响,显著增加了乳酸脱氢酶(LDH)活力,降低了GSH/GSSG值($P < 0.05$)。培养液Cd浓度为2.3 mg/L时对体腔细胞存活率和DNA损伤无显著影响。(4)MCB + Cd处理显著降低了土壤中Cd有效态含量($P < 0.05$),但没有显著降低蚯蚓对Cd的吸收;MCB + Cd处理与对照相比,蚯蚓个体存活率14 d显著下降32.1%($P < 0.05$),28 d下降51.9%,与单一Cd处理相比CAT活力显著抑制($P < 0.05$);MCB-Cd吸附产物处理组与对照组相比,体腔细胞存活率显著下降16.4%($P < 0.05$),与Cd处理相比体腔细胞DNA损伤程度显著增加($P < 0.05$)。由于MCB对蚯蚓个体和体腔细胞的生理生化指标影响增强,并且Cd被MCB吸附后对蚯蚓体腔细胞存活率和DNA损伤影响加剧,因此需谨慎选择MCB应用于土壤重金属污染修复。(图5 表2 参33)

关键词 改性纳米碳黑; 镉; 赤子爱胜蚓; 毒理效应; 土壤修复

Toxicological effects of modified nano-carbon black on earthworms in Cd-contaminated soil

XU Kun, ZHANG Xiaolin, HU Han, LI Shouwang, LU Chengxiu & CHENG Jiemin✉

College of Geography and Environment, Shandong Normal University, Jinan 250014, China

Abstract To evaluate the toxicological effects of modified nano-carbon black (MCB) applied to Cd-contaminated soil on earthworms, earthworm (*Eisenia fetida*) soil incubation tests and *in vitro* cell toxicity tests were conducted. The effects of nano-carbon black (CB) and MCB on the survival and physiological and biochemical parameters of earthworms, and the survival and DNA damage to earthworm coelomocytes were compared. Additionally, the effects of Cd, MCB + Cd, and MCB - Cd treatments on these parameters were compared. The results showed that CB was less toxic than MCB to individuals and coelomocytes of earthworms, while the application of 1.5% MCB compared with CB significantly promoted catalase (CAT) activity and decreased the glutathione (GSH)/oxidized glutathione (GSSG) value ($P < 0.05$). Moreover, the DNA damage to coelomocytes was significantly aggravated by 100 mg/L MCB *in vitro* ($P < 0.05$). Cd appeared to have no significant effects on the survival and CAT activity of individual earthworms but significantly increased the lactic dehydrogenase (LDH) activity and decreased the GSH/GSSG value ($P < 0.05$) at 5.31 mg/kg in soil. No significant effect of Cd in culture medium (2.9 mg/L) on coelomocytes was found. The available fraction of Cd in soil was significantly reduced ($P < 0.05$) by MCB + Cd treatment, however the uptake of Cd by earthworms was not significantly reduced. This treatment also decreased the survival rate of earthworms by 32.1% ($P < 0.05$) at 14 d and by 51.9% at 28 d, while significantly inhibiting CAT activity compared with that in the control. The MCB - Cd adsorption product significantly reduced the survival rate of coelomocytes by 16.4% ($P < 0.05$) compared with that in the control and significantly ($P < 0.05$) exacerbated coelomocyte DNA damage compared with that in the Cd treatment. Overall, the effects of MCB on the biochemical parameters of earthworms and coelomocytes were enhanced due to surface modification, and the effects of Cd on the coelomocyte survival rate and DNA damage were intensified following combination with MCB. It is therefore necessary to be cautious when

收稿日期 Received: 2019-07-28 接受日期 Accepted: 2019-12-15

国家自然科学基金项目(41877119、41471255)和国家重点研发计划项目(2018YFD0800306、2018YFF0213404)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (41877119 and 41471255), and the National Key Research and Development Programme of China (2018YFD0800306 and 2018YFF0213404)

✉通讯作者 Corresponding author (E-mail: jmcheng2002@hotmail.com)

choosing MCB for the remediation of heavy metal pollution in soil.

Keywords surface modified nano-carbon black; cadmium; *Eisenia fetida*; toxicological effect; soil remediation

根据《全国土壤污染状况调查公报》(2014),我国土壤中镉(Cd)点位超标率达7%,对作物安全和人体健康产生巨大威胁。针对我国土壤轻微、轻度镉污染的特点,土壤重金属原位钝化修复技术成为研究的热点。纳米碳黑(nano-carbon black, CB)是植物体或化石燃料不完全燃烧产生的纳米级颗粒,属于多孔芳香族化合物结构,对有机污染物具有超强吸附能力但对重金属吸附力较差^[1]。对于重金属浓度超过土壤污染风险筛选值而低于风险管制值(GB 15618-2018)的农田土壤,施用合适的钝化剂可以降低土壤重金属有效态含量而满足安全生产的要求。因此,在环境污染控制领域,对CB进行表面改性制备改性纳米碳黑(modified nano-carbon black, MCB)来提高吸附络合重金属的能力^[1]。MCB可以稳定吸附水中的二价铜、Cd^[2]和五价砷^[3],且因造价相对较低,也被用于土壤重金属钝化改良^[4-6]。例如5%添加量的MCB可以使土壤有效态Cu降低81%^[4]。但是任何一项技术在对机理没有足够理解之前总是不成熟的,MCB应用于土壤环境修复之前必须弄清其包括生物效应在内的环境行为^[1]。虽然碳黑相对于其他金属类纳米材料在土壤中普遍存在且具有较好的生物相容性,但改性后MCB会在以下3个方面存在生物风险:(1)作为纳米材料,存在量子尺寸效应,这与电子空穴对产生、电子传递以及在生物体内的迁移转运息息相关^[7];(2)作为改性材料,表面性质改变会产生更多的电子供/受体活性位点^[7];(3)作为钝化剂,其在土壤中的施用量大(1%-5%)^[4],并且吸附重金属后可能会对生物产生联合毒理效应。但在土壤环境中,针对以上3个方面的研究相当有限,因此需要对应用于土壤污染修复的MCB进行生物风险评估。

赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)是典型的土壤污染评价受试动物,已被用于土壤新兴污染物如纳米材料的毒性评价;蚯蚓的死亡率、抗氧化酶活性、抗氧化物质含量和体腔细胞DNA损伤等是重要的生物标志物,可以有效反映土壤的健康和安全状况^[8-9]。因此,我们通过蚯蚓土壤培养试验、吸附实验、蚯蚓体腔细胞体外暴露毒性试验,探究(1)改性后的MCB毒性是否增加,即MCB与CB毒性的对比;(2)应用于修复典型Cd污染土壤后,MCB增加还是降低Cd对蚯蚓的毒性?解决以上科学问题对于MCB能否安全地应用于Cd污染土壤修复至关重要。

1 材料与方法

1.1 试剂和供试动物

实验用水为Milli-Q超纯水(18.2 MΩ),CdCl₂·2.5H₂O、CaCl₂、EDTA、DTPA、DMSO、无水乙醇、氢氧化钠、冰醋酸、硝酸、高锰酸钾、三乙醇胺皆为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。台盼蓝染液(0.4%)、磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)购自北京索莱宝科技有限公司。愈疮木酚甘油醚、2-(N-吗啉)乙磺酸(MES)为生化试剂,购自上海阿拉丁。RPMI-1640培养基(含10%胎牛血清和1%双抗)购自南京凯基生物。供试赤子爱胜蚓购买于江苏省句容市王军蚯蚓养殖基地,实验前在受试土壤中驯化一周。选取2月龄以上成熟的蚯蚓进行正式培养试验,蚯蚓体重0.47 g ± 0.06 g (N = 150)。蛋白定量、过氧化氢酶(Catalase, CAT)活力、乳酸

脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)活力、总谷胱甘肽(Total glutathione, T-GSH)和氧化型谷胱甘肽(Oxidized glutathione, GSSG)定量、MTT细胞毒性检测、DNA损伤检测所用试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

1.2 纳米碳黑表征及改性

纳米级碳黑(CB)购自济南某碳黑厂,透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM, JEOL, Japan)拍照观察,计数100个颗粒计算其平均粒径。CB形貌不规则,原生平均粒径约为47 (±17) nm (N = 100),颗粒多以团聚状态存在(图1)。纳米颗粒表面金属杂质会干扰其毒性机理的判断,利用扫描电镜能谱仪(scanning electron microscope-electron energy spectrometer, SEM-EDS, FEI-Prisma-E, Thermo Fisher Scientific)分析其表面元素组成,高清X射线荧光光谱仪(HD X-ray fluorescence spectrometer, HDXRF, Cadence, XOS, USA)测定颗粒含Cd及其他重金属杂质总量。电子能谱EDS(图1)显示,颗粒表面C元素原子百分比超过98.9%,仅含少量Si(0.70%)和S(0.38%)杂质,Cadence高清XRF仪对颗粒物中Cd具有较高的分辨率,CB中含Cd量仅为0.000 1%,而其他40种金属杂质含量总和也不超过2.5%。

MCB的制备方法^[3]:每10 g碳黑加入120 mL酸性高锰酸钾(20% HNO₃ + 15.8 g/L KMnO₄)静置24 h,90 °C下氧化反应3 h,冷却后用去离子水洗涤至pH稳定。体外毒性实验中,CB贮备液的制备方法为将已知质量CB分散于已知体积超纯水中,超声(40 kHz)30 min,循环2次,最终浓度为1 g/L。MCB(1 g/L)涡旋振荡(Vortex-Genie 2, SI, USA)30 s即可分散均匀。

1.3 土壤培养试验

供试土壤采自山东师范大学校园农田表层0-20 cm(褐土),其基本理化性质已在前期研究^[10]中测定,土壤pH值为6.7,阳离子交换量为14.4 cmol/g,有机质含量为2.7%,最大持水量为60.5%。土壤重金属Cu、Zn、Pb、Cd、Ni全量分别为3.85、234.33、4.30、0.28、2.58 mg/kg。首先向每2 kg风干土中添加100 mg/L的Cd²⁺溶液0.1 L,室内干湿交替平衡两个月配制Cd污染土壤,Cd的外源添加量为5 mg/kg,该浓度设置高出风险管制值的原因是有利于毒理实验阳性结果,且该浓度在以往钝化模拟污染土壤研究中被使用^[11-12],最终测定验证污染土壤Cd含量为5.31 mg/kg。然后向每盆600 g老化后的Cd污染风干土壤及未污染土壤中添加9.0 g MCB,搅拌均匀后添加156 mL水,置于人工气候箱于20 °C,湿度78% ± 2%条件下平衡1周。同时设置等添加量的CB处理组与MCB进行比较。最终暴露处理分5组,分别是对照(Cd本底值0.38 mg/kg)、CB(15 g/kg)、Cd(5.31 mg/kg)、MCB(15 g/kg)、MCB + Cd(15 g/kg + 5.31 mg/kg),每个处理设3个平行,共15盆。

每盆放入10条蚯蚓,用纱布封口防止逃逸,放于人工气候箱中20 °C、湿度78% ± 2%的黑暗条件下培养28 d。每周称重补水一次,保持土壤水分含量为饱和持水量的50%。每盆土壤表面添加5.0 g无污染干牛粪(重金属均未检出)供蚯蚓取食。分别在14 d和28 d计数蚯蚓的存活率,蚯蚓死亡的判据是

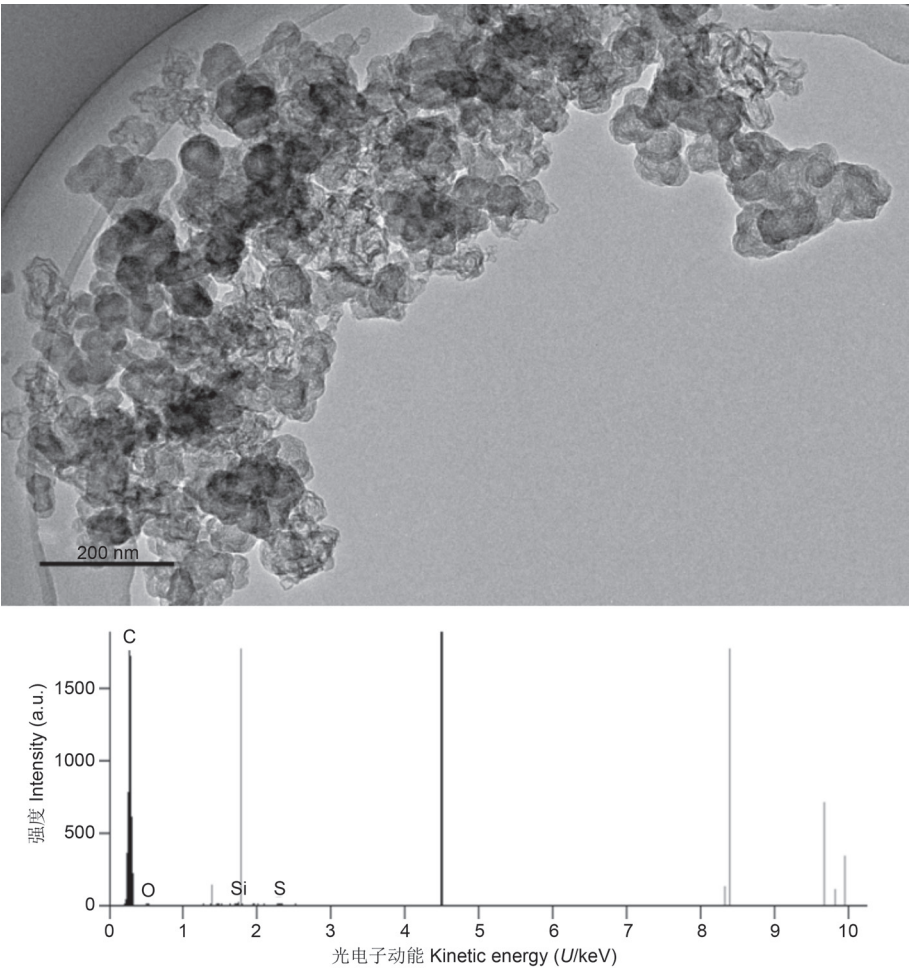


图1 纳米碳黑的透射电子显微镜图像和电子能谱图。标尺代表200 nm。
Fig. 1 Transmission electron microscopy image and electron spectroscopy of nano-carbon black. The scale bar represents 200 nm.

对机械刺激无反应或从土壤消失。实验后对照组死亡率小于20%认定实验有效。培养结束后将存活蚯蚓放于湿润滤纸上清肠3 h，液氮冻干后放于-80℃冰箱保存，进行蚯蚓体内蛋白含量、CAT活力、LDH活力、GSH和GSSG含量的测定。

1.4 体外毒性试验

相对于土壤培养试验，蚯蚓体腔细胞体外毒性试验可以快速、灵敏地反映受试材料的不良效应。采用非侵入式体腔细胞提取方法^[13-14]。取1条健康蚯蚓浸入含1 mL体腔细胞提取液（950 mL 0.85% NaCl和50 mL无水乙醇混合，含10 g/L溶粘蛋白剂愈创木酚甘油醚和2.5 g/L EDTA，1 mol/L NaOH调节pH为7.3）的1.5 mL离心管中90 s，取出蚯蚓后冷冻离心机4℃下3 000 r/min离心3 min得到沉淀细胞。用冰冷PBS离心清洗2次，在沉淀细胞中加1 mL PBS重悬细胞，将重悬细胞用PBS稀释100倍后，与台盼蓝染液9:1混合染色3 min，滴一滴悬液于汤麦氏细胞计数板上，40倍物镜（CX23, Olympus, Japan）下观察、计数。蚯蚓悬浮细胞大多数以单细胞形式存在，少数以2-10个细胞簇形式存在。95%以上细胞对台盼蓝拒染，细胞密度为1 × 10⁶/mL。

稀释CB或MCB贮备液到125 mg/L得到单一纳米材料染毒溶液备用。

MCB-Cd复合染毒溶液配制步骤为：（1）首先通过吸附实验制备MCB-Cd复合物。配制0-2 mmol/L Cd²⁺溶液（含0.01 mol/L NaCl，12.5 mmol/L MES，pH 5.5），称取0.1 g

MCB加入25 mL Cd溶液，25℃恒温振荡12h，离心后取上清液原子吸收测定Cd含量，吸附量通过差减法计算得出：

$$q = \frac{(\rho_0 - \rho_e)V}{m}$$

其中，*q*是平衡吸附量（mg/g）； ρ_0 和 ρ_e 分别是Cd的初始浓度和平衡浓度（mg/L）；*m*为MCB质量0.1 g；*V*为25 mL。MCB对Cd的最大吸附量为28.4 mg/g，吸附更符合Langmuir等温线（*R*² = 0.971，表1，图2），为单分子层吸附。（2）制备染毒溶液。将吸附Cd近饱和后的MCB（吸附量为23.4 mg/g）用无水乙醇和去离子水依次清洗2次、风干、收集，取12.5 mg上述样品加入100 mL培养液，浓度为125 mg/L，含Cd 2.9 mg/L。同时配制浓度为2.9 mg/L Cd单一染毒溶液。所有染毒溶液均使用RPMI-1640培养基配制或稀释（pH = 7.4）^[13]。使用96孔板进行蚯蚓体腔细胞的体外培养。每孔滴加160 μL不同处理的染毒溶液和40 μL密度为1 × 10⁶/mL的细胞悬液，最终得到5组处理：CK（RPMI-1640培养基）、CB（100 mg/L）、MCB（100 mg/L）、Cd（2.3 mg/L）、MCB（100 mg/L）-Cd（2.3 mg/L），每个处理设置3个平行孔。细胞在25℃、无CO₂条件

表1 MCB对Cd的吸附等温线参数
Table 1 Parameters of adsorption isotherm of Cd by MCB

Langmuir吸附等温线 Adsorption isotherm $y = (qkx)/(1 + kx)$			Freundlich吸附等温线 Adsorption isotherm $y = Kx^n$		
<i>q</i>	<i>k</i>	<i>R</i> ²	<i>K</i>	<i>n</i>	<i>R</i> ²
28.4	4.9	0.971	23.64	0.38	0.905

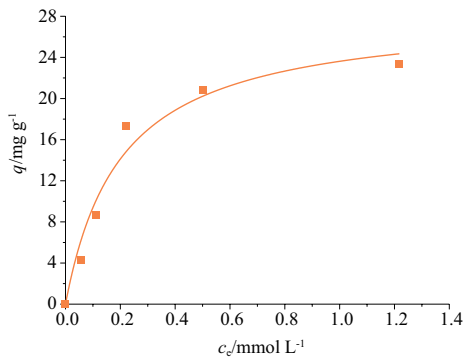


图2 MCB对Cd的吸附等温线。

Fig. 2 Adsorption isotherm of Cd by MCB.

下暴露染毒12 h^[13]。试验独立进行2次,一次用于细胞存活率测定,一次用于DNA损伤测定。

1.5 分析方法

土壤经HCl-HNO₃-HClO₄消解^[15]后用HK-8100型电感耦合等离子体光谱仪(inductively coupled plasma spectrometer, ICP)测定重金属含量。土壤有效态Cd采用DTPA浸提法(液土比为2:1, pH = 7.3),恒温水浴振荡器140 r/min振荡2 h后用火焰原子吸收光谱法(Atomic absorption spectrometer, AAS, TAS-900, 普析通用, 北京)测定。土壤培养实验中,蚯蚓培养前通过HNO₃-HClO₄ (4:1)消解, ICP测定体内Cu、Zn、Pb、Cd、Ni含量分别为0.19、20.0、2.11、3.33、1.67 mg/kg。蚯蚓培养后吸收Cd量的测定方法:每组取3条蚯蚓, 80 °C烘干, 研磨过80目筛后平分3份, 利用HNO₃-HClO₄消解^[15], 透明消化液经过滤冲洗, 定容至25 mL用AAS测定Cd含量。另从对照组取3条蚯蚓, 进行加标回收率的测定, 该方法Cd的加标回收率为100.2%。每盆随机挑选3条蚯蚓, 按质量体积比1:9加入冰冷的0.85%生理盐水机械电动匀浆得到10%的组织匀浆液, 进行蛋白含量的测定。将上述匀浆液稀释10倍, 测定CAT活性、LDH活性。蛋白含量测定采用考马斯亮蓝法, 紫外-可见分光光度计(UV1601, 北京瑞利) 595 nm处测定反应液的吸光度; CAT活性采用钼酸铵终止法, 405 nm测定黄色复合物的吸光度, 定义每毫克组织蛋白每秒钟分解1 mmol的H₂O₂的量为一个活力单位; LDH活性采用微量酶标法, 定义37 °C每克组织蛋白与基质作用1 min, 反应体系中产生1 mmol丙酮酸为1单位, 酶标仪(Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific) 450 nm读取反应液吸光度。每盆另取1条蚯蚓, 用试剂盒中提供的匀浆介质按质量体积比1:4匀浆, 利用DTNB[5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)]循环法测定T-GSH和GSSG的含量。GSH含量是T-GSH含量与2倍GSSG含量的差值。以上指标测定严格按照试剂盒说明书进行。

体外毒性实验中,新鲜体腔细胞悬浮液(5 mL)中重金属含量测定采用HNO₃: H₂O₂ (1:1)消解法, ICP测定每个细胞中Cu、Zn、Pb、Cd、Ni平均含量分别为19、231、93、28、11 fg。体腔细胞存活率测定采用MTT还原甲臢法。细胞用PBS清洗2次后,每孔加50 μL MTT溶液,在25 °C孵育4 h, 300 r/min离心后吸出上清液,每孔加150 μL DMSO,用平板摇床摇匀。再次离心后取上层清液,在570 nm处用酶标仪检测光密度(optical density, OD)。相对细胞存活率=(处理组OD值-对照组OD均值)/对照组OD均值×100%。DNA损伤实验采用彗星实验又称单细胞凝胶电泳法,经三明治式铺胶-细胞裂解-DNA碱解旋-水平电泳槽电泳(25 V, 30 mA, DYY-6D型,

北京六一)后,用0.4 mmol/L Tris-HCl (pH = 7.5)中和3次,每载玻片滴加20 mL PI染液避光染色10 min,于荧光显微镜下G波段激发光观察拍照。采用CASP软件计算20个细胞的Olive尾矩(olive tail moment, OTM, DNA头部重心到尾部重心的距离与DNA尾部百分百的乘积)指标,计数时选取具有单峰的未死亡细胞的DNA图像。

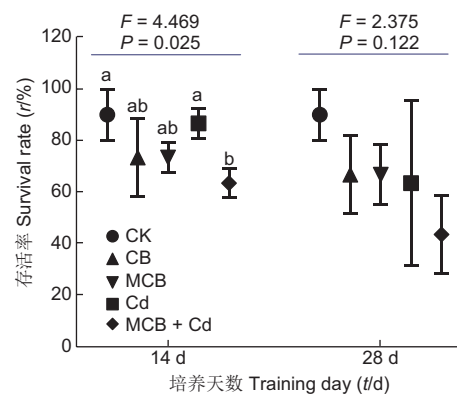
1.6 数据处理

数据进行Shapiro-Wilk正态性检验与Levene's方差齐性检验后,采用单因素方差分析进行显著性检验(显著性水平0.05, 检验统计量F),以及Duncan多重比较,以不同字母区分处理组间的显著性差异($P < 0.05$)。统计分析软件为SPSS 21.0。

2 结果与分析

2.1 土壤培养试验结果

土壤培养结束时,蚯蚓生存状态良好,对照组蚯蚓28 d死亡率小于20%,认定实验有效。由图3可见,与对照相比,CB、MCB、Cd和MCB + Cd处理组蚯蚓存活率在14 d分别降低了21.4%、21.4%、3.6%和32.1% ($F = 4.469$, $N = 3$, $P = 0.025$);在28 d时分别降低了25.9%、25.9%、29.6%和51.9%,但由于较大的组内偏差,各处理组间统计差异不显著($F = 2.375$, $N = 3$, $P = 0.122$)。各处理组蚯蚓存活率都有不同程度的降低,说明外源添加物质都对蚯蚓产生干扰;干扰程度随着时间的延长而增加但变异性也同时增加。与对照相比,CB组蚯蚓存活率下降但不显著($P > 0.05$),说明CB纳米粒径本身对蚯蚓存活影响较小。MCB组蚯蚓存活率与CB组相同,说明材料表面改性对蚯蚓的存活率无明显影响。同时添加Cd和MCB与单独添加Cd相比,蚯蚓14 d存活率显著下降($P < 0.05$),28 d存活率下降但不显著($P > 0.05$)。

图3 不同处理对蚯蚓存活率的影响。竖条表示标准偏差 ($N = 3$)。CK: 对照; CB: 纳米碳黑; MCB: 改性纳米碳黑。Fig. 3 Effects of treatments on survival rate of earthworms individuals. Vertical bars indicate standard deviation ($N = 3$). CK: Control; CB: Nano-carbon black; MCB: Modified nano-carbon black.

考虑到蚯蚓对污染物具有很强的耐受能力,存活率指标不能完整反映蚯蚓受到胁迫的状况,因此通过对尚存活蚯蚓生理生化指标的测定来判断蚯蚓对胁迫响应和适应的机制。由图4可知,与对照相比,各外源物质处理组蚯蚓组织蛋白含量都有不同程度的下降,但无显著性($P > 0.05$)。CB处理组的CAT活力、GSSG含量及GSH/GSSG比值变化不显著($P > 0.05$),LDH含量显著升高($P < 0.05$)。MCB处理

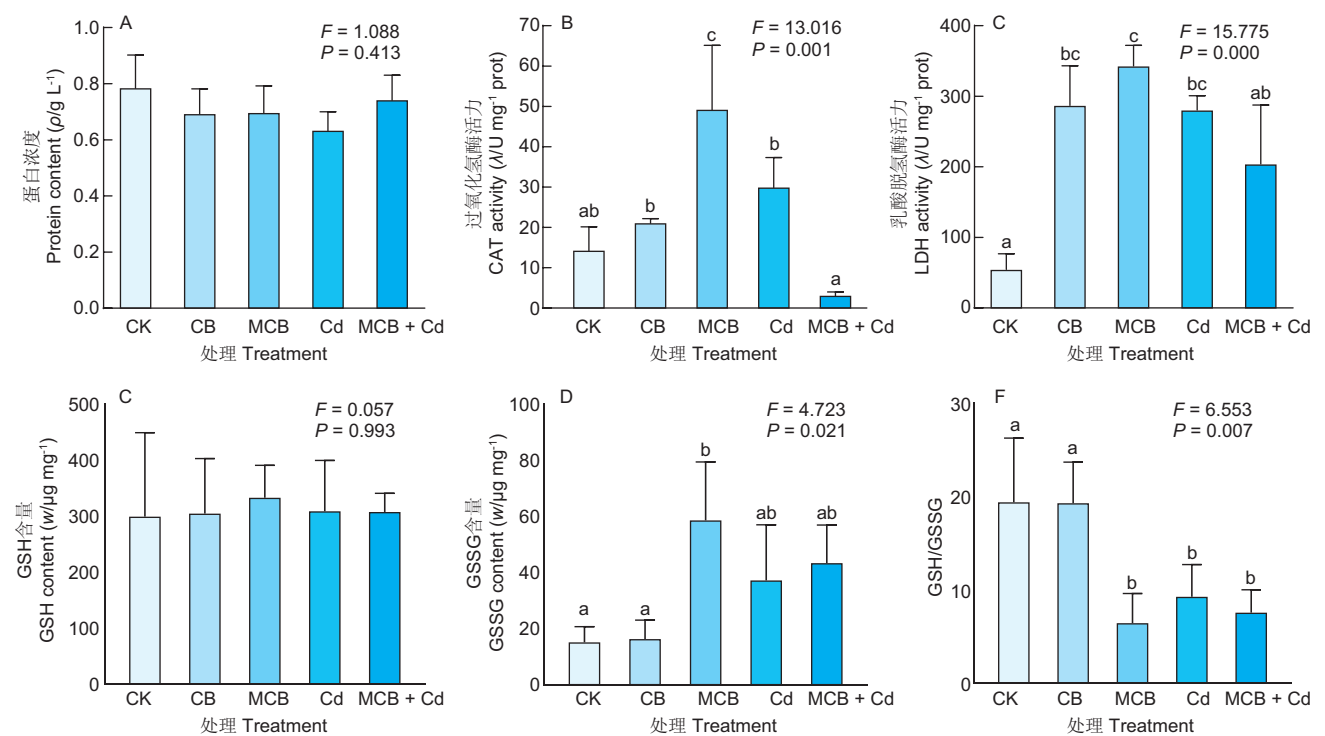


图4 不同处理对蚯蚓生理生化指标的影响。(A) 蛋白含量;(B) 过氧化氢酶 (CAT) 活力;(C) 乳酸脱氢酶 (LDH) 活力;(D) 还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量;(E) 氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 含量;(F) 还原型谷胱甘肽与氧化型谷胱甘肽比值。竖条表示标准偏差 (N = 3)。CK: 对照; CB: 纳米碳黑; MCB: 改性纳米碳黑; MCB + Cd: 改性纳米碳黑和镉共存。

Fig. 4 Effects of treatments on the physiological and biochemical indexes of earthworms. (A) Protein content; (B) Catalase (CAT) activity; (C) Lactate dehydrogenase (LDH) activity; (D) Reduced glutathione (GSH) content; (E) Oxidized glutathione (GSSG) content; (F) Content ratio of GSH and GSSG. Vertical bars indicate standard deviation (N = 3). CK: Control; CB: Nano-carbon black; MCB: Modified nano-carbon black; MCB + Cd: Coexistence of modified nano-carbon black and cadmium.

表2 培养前后土壤有效态镉含量和蚯蚓体内镉含量变化 (N = 3)

Table 2 Changes of available Cd content in soil and Cd content in earthworms before and after culture

处理 Treatment	土壤中有效态镉含量 Available Cd content in soil (w/g kg ⁻¹)		蚯蚓体内Cd含量 Cd content in earthworms (w/mg kg ⁻¹)	
	培养前 Before incubation	培养后 After incubation	培养前 Before incubation	培养后 After incubation
CK	0.10 ± 0.02 ^a	0.11 ± 0.01 ^a		5.50 ± 0.29 ^{a***}
Cd	2.87 ± 0.75 ^c	2.28 ± 0.23 ^c	3.3 ± 0.63	49.08 ± 1.41 ^{b***}
MCB + Cd	1.92 ± 0.24 ^b	1.54 ± 0.44 ^b		50.58 ± 0.84 ^{b***}

不同字母代表处理组之间 (行间) 存在显著性差异 (P < 0.05, N = 3)。星号代表培养前后数据存在显著性差异 (** P < 0.05, *** P < 0.001, N = 3)。CK: 对照; CB: 纳米碳黑; MCB: 改性纳米碳黑; MCB + Cd: 改性纳米碳黑和镉共存。

Different letters represent significant differences between treatment groups (between rows) (P < 0.05, N = 3). Asterisks represent significant differences in data before and after culture (** P < 0.05; *** P < 0.001; N = 3)。CK: Control; CB: Nano-carbon black; MCB: Modified nano-carbon black; MCB + Cd: Co-exposure of modified nano-carbon black and cadmium.

组蚯蚓体内LDH活力与CB处理组一样比对照组显著增强, CAT活力比CB处理组显著升高、GSSG含量显著增加、GSH/GSSG值显著减小 (P < 0.05)。与对照相比, 外源添加Cd处理组LDH活力显著升高 (P < 0.05), CAT活力、GSSG含量上升但不显著 (P > 0.05), GSH/GSSG显著降低 (P < 0.05)。同时添加MCB和Cd与单独添加Cd相比, CAT活力显著下降 (P < 0.05), LDH活力及GSH/GSSG无明显变化; 与对照相比, CAT和LDH活力变化不显著, GSH/GSSG显著降低 (P < 0.05)。为探究Cd在蚯蚓体内富集和MCB对蚯蚓摄食Cd的影响及其与毒理效应的关系, 对含Cd处理组土壤有效态Cd含量和蚯蚓体内Cd含量分析 (表2) 发现: (1) 由于自然土壤背景Cd的存在, 培养前 (驯化一周后) 蚯蚓体内已积累3.3 mg/kg干重的Cd。(2) 外源添加Cd平衡两月后, Cd有效态含量占总镉含量的54%, 添加1.5% MCB后, 土壤有效态镉含量下降到36%, 证明MCB对土壤Cd有较好的钝化能力。培养蚯蚓28 d对土壤有效态Cd无显著影响。(3) 外源Cd处理组蚯蚓体内

吸收的Cd含量增加, 是土壤有效态Cd的近20倍, 是总量Cd的近9倍。这与蚯蚓体内Cd是土壤Cd的5-7倍相近^[16]。(4) 尽管添加MCB降低了土壤Cd有效态, 但并没有降低蚯蚓体内Cd含量。

2.2 体外毒性试验

蚯蚓体腔细胞是一种免疫细胞。相比于中期或长期土壤培养试验, 利用离体蚯蚓体腔细胞可以快速评估受试化学物质毒性。与对照相比 (100%), CB处理组细胞存活率仅下降5%, 说明CB的细胞毒性较小, 与前人的研究结果^[17]一致。与CB组相比, MCB处理组存活率变化不显著, 与对照相比细胞存活率下降显著 (P < 0.05), 说明表面性质改变后颗粒的细胞毒性增加。Cd处理组与对照相比变化不明显, 说明体腔细胞对2.3 mg/L的Cd有一定耐受能力。而MCB吸附Cd后的处理组 (MCB-Cd) 与Cd处理组 and 对照组相比, 细胞存活率分别下降了12.0%和16.4% (P < 0.05), 说明MCB与Cd结合后对细胞的毒性增强 (图5A)。

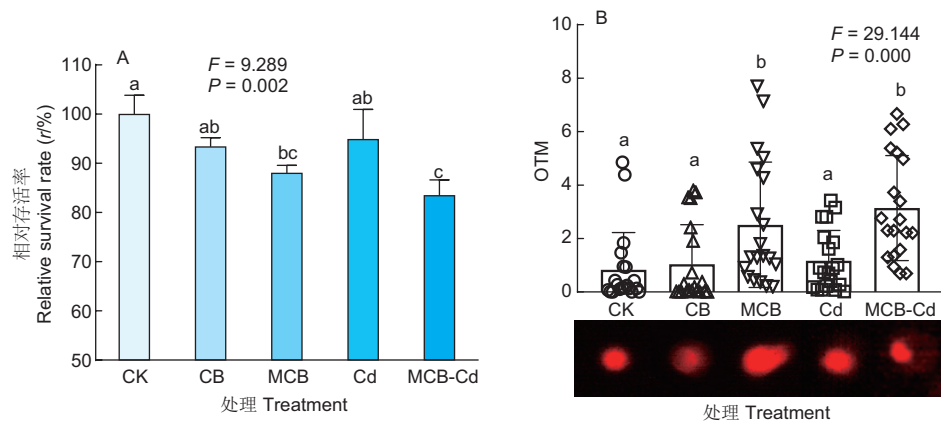


图5 不同处理对蚯蚓体腔细胞存活率 ($N = 3$, A) 和DNA损伤的影响 ($N = 20$, B). OTM: Olive尾矩; CK: 对照; CB: 纳米碳黑; MCB: 改性纳米碳黑; Cd: 镉; MCB-Cd: 改性纳米碳黑和镉吸附结物。

Fig. 5 Effect of different treatments on survival rate ($N = 3$, A) and DNA damage of coelomocytes ($N = 20$, B) from earthworms. OTM: Olive tail moment; CK: Control; CB: Nano-carbon black; MCB: Modified nano-carbon black; MCB-Cd: Modified nano-carbon black and cadmium conjugate by adsorption.

当细胞活性氧增加时, 多余的活性氧会攻击DNA, 使DNA断键产生较小的片段, DNA损伤程度的大小可以由彗星实验体现。通过彗星实验(图5B), 发现对照组DNA荧光呈致密圆形, 且头部较大没有慧尾, OTM统计值较小, 是正常细胞的实验现象。CB组OTM统计值与对照相比无显著性差异, 说明CB纳米颗粒本身不会产生基因毒性。MCB组与CB组相比, 出现较长的慧尾, 且OTM统计值显著升高。说明氧化改性后纳米颗粒的基因毒性增加。Cd处理组尽管部分细胞核DNA出现拖尾, 但与对照组相比OTM统计平均值差异不显著。而暴露于MCB-Cd吸附产物处理组与对照和Cd处理组相比, 细胞拖尾现象明显, OTM统计值显著增大。比较Cd处理组和MCB-Cd处理组可以得出 MCB-Cd的基因毒性可能主要由MCB引起, 与Cd关系不大。

3 讨论与结论

为探究应用于土壤重金属修复的MCB是否具有毒性, 其毒性产生的诱因是纳米颗粒本身产生还是表面改性产生, 其应用于Cd污染土壤修复对Cd的毒性有何影响, 本研究通过蚯蚓土壤培养试验和体外毒性试验进行了评估。需要说明的是, 本研究中的土壤培养试验部分供试土壤为自然土壤, 具有一定的重金属本底值, 但均未超过《土壤环境质量 农用地土壤风险管控标准(试行)》(GB15618-2018)中相应的风险筛选值, 可视为无污染土壤。以往的研究中含有重金属背景的土壤也被用作对照处理^[18-19]。试验中对照组蚯蚓个体和体腔细胞中同样积累了有少量的Cd, 但不足以产生显著的生理生化变化。根据控制变量原则, 由于所有处理中使用的土壤和细胞均相同, 蚯蚓个体及体腔细胞各指标的变化可视为由单一变量即不同处理引起。

3.1 CB的毒理效应

以往的研究中主要关注CB经大气环境对生物的效应, 例如早期粒子毒理学研究表明碳黑超细或纳米粒子会产生肺部毒性^[17, 20], 引起肺部炎症和基因损伤^[21]。关于CB对土壤动物影响的研究较少。本研究发现1.5%土壤添加量的CB对蚯蚓存活率具有轻微影响但不显著(图3), 这与大部分碳纳米材料如碳纳米管对蚯蚓毒性较低的研究^[9, 13, 22]相符。为进一步探究CB的潜在毒性, 选取蚯蚓的几种重要生理生化指标进行了

测试。CAT和GSH是蚯蚓体内重要的抗氧化物质。CAT可以促进机体内有毒的过氧化氢转化为水和氧气^[23]; GSH参与解毒过程结合反应, 将有害的毒物转化为无害的物质排泄出体外, GSH与其解毒产物GSSG含量的比值越小, 机体所受氧化压力越大^[23]。蚯蚓的CAT和GSH/GSSG指标与对照相比变化不显著(图4), 说明CB纳米颗粒本身对蚯蚓抗氧化系统影响较小。LDH是机体能量代谢中的一种重要酶, 细胞上清液中的LDH活力越高代表LDH渗漏率越高, 细胞膜损伤越严重^[24]。CB处理组蚯蚓的LDH活性升高, 表明CB可能对细胞膜造成损伤。本研究中100 mg/L的CB对蚯蚓体腔细胞存活抑制不显著(图5), 这与Kong等50 mg/L粒径为14 nm的CB对小鼠免疫细胞RAW 246.7存活率无明显影响的结果^[17]相近。这一研究结果表明, 尽管纳米材料由于粒径极小被公认为具有潜在毒性^[7], 但CB对土壤动物蚯蚓的毒性相对较小。

3.2 MCB的毒理效应及改性的影响

表面性质是影响纳米级颗粒毒性的主要因素^[7]。研究表明酸改性后纳米颗粒的毒性有增强的趋势^[25-26]。与未功能化超细碳黑相比, 暴露于40 μg 酸功能化超细碳黑的老鼠肺泡灌注液中中性粒细胞含量显著增加, 乳酸脱氢酶活性及蛋白含量显著上升, 心脏功能受到显著抑制^[25]。有关MCB对土壤动物效应的报道较少。Zhao等研究发现硫酸和硝酸改性的纳米碳黑对种植黑麦草的土壤中蚯蚓的存活率具有显著的负效应且暴露35 d和60 d时引起强烈的氧化应激反应^[27]。我们前期通过滤纸接触实验发现, 与CB相比, MCB能诱导蚯蚓产生更高的氧化应激水平; 而且蚯蚓对施加MCB的土壤具有更强的回避现象^[10]。本研究中, MCB对蚯蚓个体的存活率影响不显著(图3), 却显著降低了体腔细胞的存活率(图5), 印证了体腔细胞毒性试验更加灵敏。与未改性CB处理相比, MCB显著增加了蚯蚓CAT活性和GSSG产生量, 诱导蚯蚓的氧化应激反应。当蚯蚓体内活性氧含量升高时, 抗氧化系统活力被激发, 导致大量CAT产生, 用来清除过氧化氢, 保护机体免受氧化胁迫的伤害。同时还原性解毒物质GSH与活性氧结合导致氧化型GSSG积累, 而GSH各MCB与CB之间以及各处理组间都无显著变化, 这是因为GSH调控基因的表达使其处在稳定水平以应对不良胁迫。另外100 mg/L MCB造成显著的体腔细胞DNA损伤, 这可能是导致细胞存活率降低的原因之一。但DNA损伤并没有强烈地反馈到个体死亡率上, 这一方面是因

为体腔细胞的响应更为灵敏,另一方面可能是因为从DNA损伤到个体死亡需要一定的时间。上述研究结果表明,MCB主要诱导了蚯蚓亚致死指标响应和细胞毒性,与CB相比含氧官能团的增加可能是导致其毒性增加的主要原因。

3.3 Cd的毒理效应

Cd具有肾毒性、致癌性、致畸性、内分泌干扰和生殖毒性^[28],Cd不是人体的必需元素,但由于离子半径、电子排布等的相似性,摄入的Cd与Zn、Cu等元素具有相似的代谢途径而影响生物体正常的生理活动。CdNO₃对赤子爱胜蚯蚓的半致死浓度(LC₅₀)滤纸接触约为10 mg/cm²,人工土壤介质中为374 mg/kg^[29];草甸棕壤中Cd(CdCl₂)的LC₅₀为900 mg/kg^[30]。本研究土壤中Cd背景浓度(0.28 mg/kg)和Cd处理终浓度5.31 mg/kg远低于致死剂量,受试蚯蚓没有出现显著性死亡。有研究表明在对照组Cd背景含量为1.8 mg/kg的自然土壤中,蚯蚓的抗氧化酶(超氧化歧化酶和CAT)、相I酶(细胞色素P450)、相II酶(谷胱甘肽转硫酶)在8周的培养时间里均稳定在较低水平,额外添加2.5 mg/kg的Cd会在第3周、4周显著增加细胞色素P450含量,6周、8周显著增加CAT活力^[18]。本研究中5 mg/kg在4周时并没有显著引起CAT活力变化(图4B),这可能与CAT酶反应的滞后性有关;LDH酶活力显著增加(图4C),这可能与Cd与细胞膜受体蛋白结合,改变膜通透性和溶酶体内物质的分泌有关^[31]。培养4周,蚯蚓体内Cd显著积累,降低了GSH/GSSG值(图4D)说明外源添加5 mg/L的Cd对蚯蚓体内氧化还原平衡产生一定的影响。不同的土壤类型、有机质含量、培养时间都会影响蚯蚓的亚致死指标变化,这为未来的工作提供了启示。采用体腔细胞体外暴露12 h发现,含2.3 mg/L Cd的培养液中细胞死亡率和基因毒性与对照相比无显著变化,且对照组DNA比较完整(图5),说明体外暴露试验条件下,受试浓度Cd对体腔细胞无显著影响,这可能得益于体腔细胞通过免疫机制如自噬和溶酶体功能及时清除^[17]。

3.4 MCB对Cd毒理效应的影响

土壤培养实验中(图3和4),MCB处理组的蚯蚓个体存

活率与对照相比无明显变化,而MCB + Cd处理组的个体存活率显著降低,MCB+Cd处理对蚯蚓生化指标的影响除CAT活性外与Cd处理无明显差异。MCB虽然降低了Cd的有效性(表2),但没有降低蚯蚓对Cd的吸收。一方面可能是因为蚯蚓肠道内小分子物质将结合态的重金属络合出来,增加了Cd的生物可给性。另一方面MCB可能负载Cd进入蚯蚓体内。许多研究表明碳纳米材料如石墨烯、碳纳米管、碳黑均可吸附重金属或有机物迁移转运进入细胞,增加重金属的毒性^[17, 22, 32],但是由于技术限制及荧光和同位素标记会影响颗粒表面性质,本研究未进行蚯蚓体内纳米碳黑颗粒的测定,在今后的研究中需突破这一难点。吸附实验证明MCB对Cd具有较好的单分子层吸附能力(图2,表1),这为二者共迁移提供了可能。体外毒性试验中(图5),MCB-Cd处理的细胞存活率比Cd处理组显著降低了11.7%,表征基因毒性的OTM统计值增加了1.7倍。这印证了土壤培养试验结果的猜测,即MCB吸附Cd后增强了Cd的毒性,其具体机制可能与细胞的自噬和溶酶体功能障碍有关^[17]。综上所述,土壤培养实验和体外实验中MCB+Cd/MCB-Cd处理的毒性均比单一Cd污染物毒性增加,即MCB会增强Cd对蚯蚓的毒性。MCB与Cd的联合作用类型尚需通过开展不同浓度配比的MCB和Cd暴露试验进一步探究。

3.5 MCB应用于Cd污染土壤修复的探索

我们之前的研究表明,添加MCB增加了黑麦草的生物量且增长率随添加量增加而增加^[5-6]。MCB会提高土壤脲酶活性,有利于土壤速效养分保持^[33]。但植物和土壤酶活性指标不能充分说明MCB的安全性,本研究通过土壤培养试验和体腔细胞毒性实验发现MCB会诱导蚯蚓个体亚致死指标的响应和细胞基因毒性。Cd与MCB共存时蚯蚓的个体存活率降低,蚯蚓细胞DNA损伤程度增加,这有违背土壤修复的初衷,因此将其应用于土壤重金属修复应保持谨慎。MCB的施加量和适用的Cd浓度范围仍需优化,如何权衡二次污染和初始污染的关系仍是难题。MCB在植物、动物、微生物同时存在的复杂土壤系统中,其生物效应如何仍是未来需解决的科学问题。

参考文献 [References]

- 成杰民. 改性纳米黑碳应用于钝化修复重金属污染土壤中的问题探讨[J]. 农业环境科学学报, 2011, 30 (1): 7-13 [Cheng JM. Discussion on application of modified nano-particle black carbon for the remediation of soil heavy metals pollution [J]. *J Agro-Environ Sci*, 2011, 30 (1): 7-13]
- Zhou DM, Wang YJ, Wang HW, Wang SQ, Cheng JM. Surface-modified nanoscale carbon black used as sorbents for Cu(II) and Cd(II) [J]. *J Hazard Mater*, 2010, 174 (1-3): 34-39
- Borah D, Satokawa S, Kato S, Kojima T. Surface-modified carbon black for As(V) removal [J]. *J Colloid Interf Sci*, 2008, 319 (1): 53-62
- 王汉卫, 王玉军, 陈杰华, 王慎强, 成杰民, 周东美. 改性纳米碳黑用于重金属污染土壤改良的研究[J]. 中国环境科学, 2009, 29 (4): 431-436 [Wang HW, Wang YJ, Chen JH, Wang SQ, Cheng JM, Zhou DM. Application of modified nano-particle black carbon for the remediation of soil heavy metal pollution [J]. *China Environ Sci*, 2009, 29 (4): 431-436]
- Cheng J, Sun Z, Yu Y, Li X, Li T. Effects of modified carbon black nanoparticles on plant-microbe remediation of petroleum and heavy metal co-contaminated soils [J]. *Int J Phytoremediat*, 2019, 21 (7): 634-642
- Lyu Y, Yu Y, Li T, Cheng J. Rhizosphere effects of *Lolium perenne* L. and *Beta vulgaris* var. *cicla* L. on the immobilization of Cd by modified nanoscale black carbon in contaminated soil [J]. *J Soil Sediment*, 2018, 18 (1): 1-11
- Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel [J]. *Science*, 2006, 311 (5761): 622-627
- Hu CW, Li M, Cui YB, Li DS, Chen J, Yang LY. Toxicological effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida* [J]. *Soil Biol Biochem*, 2010, 42 (4): 586-591
- Zhang L, Hu C, Wang W, Ji F, Cui Y, Li M. Acute toxicity of multi-walled carbon nanotubes, sodium pentachlorophenate, and their complex on earthworm *Eisenia fetida* [J]. *Ecotox Environ Safe*, 2014, 103 (1): 29-35

- 10 Xu K, Liu YX, Wang XF, Cheng JM. Effect of nano-carbon black surface modification on toxicity to earthworm (*Eisenia fetida*) using filter paper contact and avoidance test [J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2019, **103** (1): 206-211
- 11 Sun Y, Wang R, Ye L, Xu Y, Lin W, Liang X, Liu W. In situ immobilisation remediation of cadmium in artificially contaminated soil: a chemical and ecotoxicological evaluation [J]. *Chem Ecol*, 2015, **31** (7): 594-606
- 12 王刚, 孙育强, 杜立宇, 吴岩, 梁成华, 王沛文, 郭炜辰. 石灰与生物炭配施对不同浓度镉污染土壤修复[J]. 水土保持学报, 2018, **32** (6): 381-385 [Wang G, Sun YQ, Du LY, Wu Y, Liang CH, Wang PW, Guo WC. Study on remediation of Cd-contaminated soils with different concentrations of lime and biochar [J]. *J Soil Water Conserv*, 2018, **32** (6): 381-385]
- 13 Yang Y, Xiao Y, Li M, Ji F, Hu C, Cui Y. Evaluation of complex toxicity of carbon nanotubes and sodium pentachlorophenol based on earthworm coelomocytes test [J]. *PLoS ONE*, 2017, **12** (1): e0170092
- 14 Eyambe GS, Goven AJ, Fitzpatrick LC, Venables BJ, Cooper EL. A non-invasive technique for sequential collection of earthworm (*Lumbricus terrestris*) leukocytes during subchronic immunotoxicity studies [J]. *Lab Anim-UK*, 1991, **25** (1): 61-67
- 15 Cheng J, Ming HW. Effects of earthworms on Zn fractionation in soils [J]. *Biol Fert Soils*, 2002, **36** (1): 72-78
- 16 王振中, 张友梅, 胡觉莲, 郑云有, 胡朝阳, 郭永灿, 赖勤, 颜亨梅, 邓继福. 土壤重金属染对蚯蚓 (Opisthopora) 影响的研究[J]. 环境科学学报, 1994, **14** (2): 236-243 [Wang ZZ, Zhang YM, Hu JL, Zheng YY, Hu ZY, Guo YC, Lai Q, Yan HM, Deng JF. Effect of heavy metal in soil on earthworms (Opisthopora). *Acta Sci Circumst*, 1994, **14** (2): 236-243]
- 17 Kong H, Kai X, Liang P, Zhang J, Yan L, Yu Z, Cui Z, El-Sayed NN, Aldalbahi A, Nan C. Autophagy and lysosomal dysfunction: A new insight into mechanism of synergistic pulmonary toxicity of carbon black-metal ions co-exposure [J]. *Carbon*, 2017, **111**: 322-333
- 18 Yang X, Song Y, Kai J, Cao x. Enzymatic biomarkers of earthworms *Eisenia fetida* in response to individual and combined cadmium and pyrene [J]. *Ecotoxi Environ Safe*, 2012, **86**: 162-167
- 19 王辉, 谢鑫源. Cd、Cu和Pb复合污染对蚯蚓抗氧化酶活性的影响[J]. 环境科学, 2014, **35** (7): 2748-2754 [Wang H, Xie X. Effects of combined pollution of Cd, Cu and Pb on antioxidant enzyme activities of earthworms in soils [J]. *Environ Sci*, 2014, **35** (7): 2748-2754]
- 20 Oberdörster G, Ferin J, Gelein R, Soderholm SC, Finkelstein J. Role of the alveolar macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles [J]. *Environ Health Perspect*, 1992, **97**: 193-199
- 21 Modrzynska J, Berthing T, Ravn-Haren G, Jacobsen NR, Weydahl IK, Loeschner K, Mortensen A, Saber AT, Vogel U. Primary genotoxicity in the liver following pulmonary exposure to carbon black nanoparticles in mice [J]. *Part Fibre Toxicol*, 2018, **15** (1): 2
- 22 Hu CW, Zhang LJ, Wang WL, Cui YB, Li M. Evaluation of the combined toxicity of multi-walled carbon nanotubes and sodium pentachlorophenate on the earthworm *Eisenia fetida* using avoidance bioassay and comet assay [J]. *Soil Biol Biochem*, 2014, **70**: 123-130
- 23 Xue Y, Gu X, Wang X, Sun C, Xu X, Sun J, Zhang B. The hydroxyl radical generation and oxidative stress for the earthworm *Eisenia fetida* exposed to tetrabromobisphenol A [J]. *Ecotoxicology*, 2009, **18** (6): 693-699
- 24 Bagchi D, Bagchi M, Hassoun EA, Stohs SJ. *In vitro* and *in vivo* generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides [J]. *Toxicology*, 1995, **104** (1-3): 129-140
- 25 Tong H, McGee JK, Saxena RK, Kodavanti UP, Devlin RB, Gilmour MI. Influence of acid functionalization on the cardiopulmonary toxicity of carbon nanotubes and carbon black particles in mice [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, **239** (3): 224-232
- 26 Magrez A, Kasas S, Salicio V, Pasquier N, Seo J W, Celio M, Catsicas S, Schwaller B, Forró L. Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials [J]. *Nano Lett*, 2006, **6** (6): 1121-1125
- 27 Zhao S, He L, Lu Y, Duo L. The impact of modified nano-carbon black on the earthworm *Eisenia fetida* under turfgrass growing conditions: assessment of survival, biomass, and antioxidant enzymatic activities [J]. *J Hazard Mater*, 2017, **338**: 218-223
- 28 Goering P, Waalkes M, Klaassen C. Toxicology of Cadmium [M]// Goyer RA, Cherian M.G. Toxicology of metals. Berlin, Heidelberg: Springer, 1995: 189-214
- 29 Fitzpatrick LC, Muratti-Ortiz JF, Venables BJ, Goven AJ. Comparative toxicity in earthworms *Eisenia fetida* and *Lumbricus terrestris* exposed to cadmium nitrate using artificial soil and filter paper protocols [J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1996, **57** (1): 63-68
- 30 宋玉芳, 周启星, 许华夏, 任丽萍, 孙铁珩, 龚平. 土壤重金属污染对蚯蚓的急性毒性效应研究[J]. 应用生态学报, 2002, **13** (2): 187-190 [Song YF, Zhou QX, Xu HX, Ren LP, Sun TY, Gong P. Acute toxicological effects of heavy metal pollution in soils on earthworms [J]. *Chin J App Ecol*, 2002, **13** (2): 187-190]
- 31 Cui X, Wan B, Guo L-H, Yang Y, Ren X. Insight into the mechanisms of combined toxicity of single-walled carbon nanotubes and nickel ions in macrophages: role of P2X7 receptor [J]. *Environ Sci Technol*, 2016, **50** (22): 12473-12483
- 32 Tang Y, Tian J, Li S, Xue Z, Yin D, Yu S. Combined effects of graphene oxide and Cd on the photosynthetic capacity and survival of *Microcystis aeruginosa* [J]. *Sci Total Environ*, 2015, **532**: 154-161
- 33 刘玉真, 成杰民. 改性纳米黑碳对棕壤有效态Cu、酶活性和微生物呼吸的影响[J]. 湖北农业科学, 2015, **54** (3): 578-581 [Liu YZ, Cheng JM. Effects of modified nano-black carbon on content of bioavailable Cu(II), enzyme activity and microbial respiration in brown soil [J]. *Hubei Agric Sci*, 2015, **54** (3): 578-581]