

铜、锌和铅复合污染对土壤水解酶活性的影响

冯丹¹, 王金生², 滕彦国²

(1.北京师范大学水科学研究院, 北京 100875; 2.地下水污染控制与修复教育部工程研究中心, 北京 100875)

摘要:为研究土壤酶活性变化和重金属污染的关系,通过室内正交实验,考察重金属 Cu、Zn 和 Pb 复合污染对转化酶、脲酶和碱性磷酸酶 3 种水解酶活性的影响。结果发现:Cu 浓度为 400 mg·kg⁻¹ 时,脲酶和碱性磷酸酶活性分别是对照样品的 49% 和 56%;Zn 为 500 mg·kg⁻¹ 时,与对照样品酶活性相比,转化酶和碱性磷酸酶活性分别是对照样品的 97% 和 91%,脲酶活性有所增加;Pb 为 500 mg·kg⁻¹ 时,转化酶和脲酶活性比对照升高,碱性磷酸酶活性降低,是对照样品酶活性的 87%。Cu 对 3 种酶都有抑制作用,效果最显著,Zn 次之,Pb 主要体现为激活效应;考虑交互作用时,Cu×Zn 对脲酶活性有显著影响($P<0.05$),在 95% 置信区间下,Cu×Zn、Cu×Pb 对碱性磷酸酶活性影响显著;3 种水解酶中以碱性磷酸酶活性对重金属的影响反应最敏感,表明碱性磷酸酶活性可以表征土壤重金属 Cu 的污染程度。

关键词:重金属;正交实验;转化酶;脲酶;碱性磷酸酶

中图分类号:X53

文献标志码:A

文章编号:2095-6819(2015)04-0411-07

doi: 10.13254/j.jare.2014.0330

Effects of Cu, Zn and Pb Combined Pollution on Soil Hydrolase Activities

FENG Dan¹, WANG Jin-sheng², TENG Yan-guo²

(1.College of Water Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China; 2.Engineering Research Center of Groundwater Pollution Control and Remediation, Ministry of Education, Beijing 100875, China)

Abstract: To study the relations between soil enzyme activities and heavy metal pollution, the combined effects of Cu, Zn and Pb on the three hydrolase activities, including invertase (IN), urease (U) and alkaline phosphatase (ALP) were investigated via an orthogonal experiment. Results showed as the following: When the concentration of Cu was 400 mg·kg⁻¹, the U and ALP activities were decreased 51% and 44%, separately; When Zn was at 500 mg·kg⁻¹, IN and ALP activities were only decreased 3% and 9%, while U activity was increased; When Pb was at 500 mg·kg⁻¹, IN and U activities were increased, while ALP activity was decreased 13%. As a whole, Cu was considered as the most remarkable influence factor for IN, U and ALP activity regardless of interactions among the heavy metals, Zn came second, and Pb mainly showed activation. Considering interactions, Cu×Zn could significantly influence U activity ($P<0.05$), effects of Cu×Pb and Cu×Zn on ALP activity were remarkable (95% confidence interval). The response of ALP activity was more sensitive than the other two enzymes. Soil ALP activity might be a sensitive tool for assessing the pollution degree of Cu.

Keywords: heavy metals; orthogonal experiment; invertase; urease; alkaline phosphatase

随着全球范围内环境破坏的日益严重,土壤污染研究成为炙手可热的话题之一^[1-2]。重金属被认为是土壤的主要污染物,尤其是 Cu、Zn、Pb 的污染。重金属可以长期存在于土壤中,对土壤生态系统和土壤生物过程影响深远,像污水灌溉、工业活动、固体废物处置、施肥、开采矿产和汽车尾气等这些活动均可导致土壤中重金属的复合污染,并已引起普遍关注^[3]。有研究证

明,Cu 在土壤中普遍存在,适宜浓度的 Cu 和 Zn 是生物体的必需微量元素,Pb 则是土壤中最丰富的重金属污染物之一。高浓度的 Zn 可以抑制土壤的呼吸作用,低含量时能强化土壤的呼吸作用^[4]。

土壤酶是一种高分子生物催化剂,参与土壤新陈代谢和不同的生物化学反应,能将有机物质转化为生物可利用的无机物质^[5-6]。土壤酶活性是土壤的综合性指标,与土壤的呼吸作用、微生物数量、氮的矿化能力等指标相比,它更有活力,对环境因子变化更敏感,检测简单、迅速、成本低,经常被用作指示土壤的污染程度^[1]。

收稿日期:2014-11-25

基金项目:环保公益性行业科研基金重大项目(201009009)

作者简介:冯丹(1984—),女,博士,主要从事土壤和地下水污染研究。E-mail: fdlady@163.com

重金属可对土壤酶活性产生不利的影响,重金属对土壤酶活性的作用模式与土壤酶及重金属本身有关,一些重金属可以增加土壤酶活性,而一些重金属则可以通过以下 3 种方式抑制土壤酶活性:(1)与基质发生络合作用;(2)钝化酶的蛋白质活性基团;(3)与酶-基质复合体发生反应^[7-9]。本研究选择的转化酶、脲酶、碱性磷酸酶与土壤生态系统中的 C、N、P 元素循环密切相关,对作物生长具有一定的作用^[10]。

为了在一个实验中考察不同浓度的多种重金属对土壤酶活性的影响,需要一个有效的实验方法获得有价值的信息。正交实验方法考察不同浓度的多种重金属对土壤酶活性的影响,它不仅保持了传统的因子设计方法的优点,还能考虑单独因子间的相互作用。同时,它还具有高效、成本低的特点^[12-11]。目前,它已广泛应用于统计学中的最优化选择。

针对当前我国部分地区土壤重金属污染严重的现状,本文借助正交实验方法,研究从低浓度到高浓度下 Cu、Zn、Pb 复合污染对土壤酶活性的激活和抑制作用,考察重金属对酶活性的各自主效应以及两两之间相互作用对土壤酶活性的影响。从 3 种土壤水解酶中筛选出对上述重金属作用反应最敏感的土壤酶,旨在选出指示土壤重金属污染的指标酶,以期对土壤生态系统的重金属潜在风险评价提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 土壤样品

土壤采自我国西北地区某市的农田表层土壤,选取具有代表性的 5 个采样点,均采取 0~20 cm 的样品,混合均匀后带回实验室。在洁净实验室内展开、风干,挑拣其中的植物、残根、石块及其他杂物。用木碾研磨过 18 目筛子。处理后的土样装入密封袋中密封保存,备用。土壤样品的主要理化性质见表 1。

1.2 实验设计

选取转化酶、脲酶、碱性磷酸酶活性为指标,Cu、Zn、Pb 和培养时间作为因素。实验因素和水平设计列于表 2。外源污染物 Cu、Zn、Pb 复合作用对 3 种水解酶活性的影响选用 5 因素 4 水平的 $L_{16}(4^5)$ 型正交表

(实验 1),在对各因素主效应分析之后,选取 Cu、Zn、Pb 3 因素重新排定 $L_8(2^7)$ 正交表,用以考察 3 种污染物之间的交互作用对酶活性的影响(实验 2)。指标水平参照土壤环境质量标准(GB 15618—1995),Cu、Zn、Pb 分别以 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 、 $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$ 和 $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$ 溶液形式加入,充分搅匀,加水使土壤湿度保持在土壤最大持水量的 60%,置于培养箱内 25 °C 黑暗恒温恒湿培养,每个处理做 3 份平行。

表 2 正交试验设计

Table 2 Orthogonal experiment design

级别	$L_{16}(4^5)/mg \cdot kg^{-1}$				$L_8(2^7)/mg \cdot kg^{-1}$			
	Cu	Zn	Pb	培养时间/d	Cu	Zn	Pb	
水平 1	0	0	0	3	水平 1	50	80	100
水平 2	35	100	35	7	水平 2	200	400	400
水平 3	100	300	350	14				
水平 4	400	500	500	35				

1.3 测定方法

土壤 pH 值:酸度计法;土壤有机质:重铬酸钾法;阳离子交换量:氯化钡法;重金属:电热板湿法消解-ICP-AES 法;转化酶活性测定:3,5-二硝基水杨酸比色法,大小以 24 h、1 g 干土生成的葡萄糖毫克数表示;脲酶活性测定:苯酚钠-次氯酸钠比色法,大小以 24 h、1 g 干土的氨氮毫克数表示;碱性磷酸酶活性测定:磷酸苯二钠比色法,大小以 24 h、1 g 干土生成的酚毫克数表示(以上酶活性测定时均设 3 份平行,以及用水代替基质的对照样品和无土对照样品,以排除土壤和试剂中杂质的干扰)。

1.4 数据处理

数据使用 Excel 2010 和 SPSS 18.0 进行分析。

2 结果与分析

2.1 Cu、Zn、Pb 复合作用对土壤水解酶活性的影响

通过观察法获得的平均值(表 3)可知,转化酶活性、脲酶活性及碱性磷酸酶活性的最大值分别出现在处理 3、处理 1 和处理 1。对不同因素而言,分析每个水平上 3 种水解酶的平均值,转化酶活性、脲酶活性及碱

表 1 供试土壤的理化性质

Table 1 Physical and chemical characteristics of test soils

土壤类型	TN/ $mg \cdot kg^{-1}$	TP/ $mg \cdot kg^{-1}$	OM/%	pH 值	CEC/ $cmol \cdot kg^{-1}$	质地/%			重金属含量/ $mg \cdot kg^{-1}$		
						砂粒	粉粒	粘粒	Cu	Zn	Pb
壤土	1.346	623.37	1.27	8.13	12.74	18.09	45.07	38.84	21.13	51.51	11.81

注:TN 为全氮,TP 为全磷,OM 为有机质,CEC 为阳离子交换量。

性磷酸酶活性的最大值分别出现 $A_1B_1C_4D_3$, $A_1B_2C_3D_1$ 及 $A_1B_1C_1D_3$, 并且 $A_1B_1C_1D_3$ 与观察法的结果一致。

方差分析结果显示(表4),在95%置信区间下, Cu对3种水解酶活性有显著影响, Zn和Pb对3种水解酶活性影响不显著。

2.2 Cu、Zn、Pb的交互作用及各自主效应对土壤酶活性的影响

表5是观察法的分析结果,转化酶、脲酶和碱性磷酸酶活性的最大值分别出现在处理6、处理4和处理1。分析每个水平水解酶活性总和的平均值,转化酶、脲酶和碱性磷酸酶活性的最高值是 $A_2B_2C_2$, $A_1B_2C_2$ 及 $A_1B_1C_2$ 。 $A_1B_2C_2$ 与观察法结果一致,其他2个值与观察法结果相近。

方差分析结果显示(表6),这些因素与转化酶活性关系不显著; Cu和Zn对脲酶活性有显著影响($P < 0.05$), $Cu \times Zn$ 在 $P < 0.10$ 时对脲酶活性有显著影响;其他因素,如Pb、 $Cu \times Pb$ 、 $Zn \times Pb$ 与脲酶活性之间无显著差异。然而,在95%置信区间下,除了 $Zn \times Pb$,其他因素与碱性磷酸酶活性之间均有明显差异。

图1~图3是添加到土壤样品中重金属浓度与土壤酶活性之间的关系图。从图1可以看出,样品的3种土壤酶活性都比对照(没有添加外源重金属)酶活性低。Cu浓度为 $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,脲酶活性和碱性磷酸酶活性分别是对照样品酶活性的49%和56%。当Cu浓度小于 $35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,转化酶活性受到明显抑制作用,从 $35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 增加到 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,酶活性轻

表3 $L_{16}(4^5)$ 及无交互作用实验结果

Table 3 Layout of $L_{16}(4^5)$ and the results of experiment

处理编号	实验因素				土壤酶活性 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot 24 \text{ h}^{-1}$		
	A	B	C	D	转化酶	脲酶	碱性磷酸酶
	Cu	Zn	Pb	培养时间			
1	1	1	1	1	0.68 ± 0.02	0.54 ± 0.01	0.90 ± 0.08
2	1	2	2	2	0.71 ± 0.04	0.45 ± 0.02	0.85 ± 0.05
3	1	3	3	3	0.83 ± 0.02	0.38 ± 0.05	0.88 ± 0.07
4	1	4	4	4	0.61 ± 0.03	0.34 ± 0.02	0.46 ± 0.02
5	2	1	2	3	0.74 ± 0	0.24 ± 0.03	0.84 ± 0.05
6	2	2	1	4	0.57 ± 0.05	0.25 ± 0	0.69 ± 0.04
7	2	3	4	1	0.63 ± 0.02	0.52 ± 0.02	0.70 ± 0.03
8	2	4	3	2	0.65 ± 0.05	0.28 ± 0.04	0.73 ± 0.04
9	3	1	3	4	0.53 ± 0.001	0.18 ± 0.01	0.56 ± 0.02
10	3	2	4	3	0.73 ± 0.08	0.27 ± 0.04	0.80 ± 0.06
11	3	3	1	2	0.73 ± 0.06	0.23 ± 0.05	0.64 ± 0.03
12	3	4	2	1	0.62 ± 0.02	0.43 ± 0.02	0.75 ± 0.06
13	4	1	4	2	0.65 ± 0.02	0.20 ± 0.03	0.49 ± 0.02
14	4	2	3	1	0.42 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.41 ± 0
15	4	3	2	4	0.39 ± 0	0.12 ± 0	0.23 ± 0
16	4	4	1	3	0.64 ± 0.03	0.21 ± 0	0.60 ± 0.03

表4 复合作用正交试验方差分析表

Table 4 ANOVA table of $L_{16}(4^5)$ for the effect of combined Cu, Zn, Pb and incubation time on enzyme activities

变异来源	自由度	差方和			显著性		
		转化酶	脲酶	碱性磷酸酶	转化酶	脲酶	碱性磷酸酶
Cu	3	0.071	0.100	0.286	$P < 0.05$	$P < 0.05$	$P < 0.05$
Zn	3	0.004	0.002	0.020			
Pb	3	0.007	0.004	0.019			
培养时间	3	0.106	0.116	0.185	$P < 0.1$	$P < 0.1$	$P < 0.1$
误差	3	0.007	0.008	0.030			
总计	15						

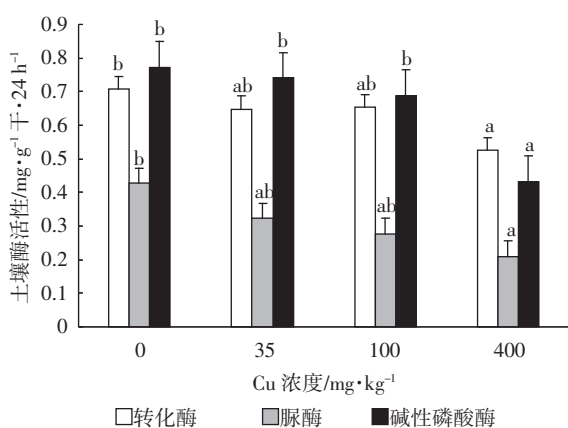
表 5 $L_8(2^7)$ 及有交互作用实验结果
Table 5 Layout of $L_8(2^7)$ and the results of experiment

处理编号	实验因素						土壤酶活性 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{干}\cdot 24\text{h}^{-1}$		
	A	B	A × B	C	A × C	B × C	转化酶	脲酶	碱性磷酸酶
	Cu	Zn	Cu × Zn	Pb	Cu × Pb	Zn × Pb			
1	1	1	1	1	1	1	0.70 ± 0.06	0.183 ± 0.02	0.73 ± 0.05
2	1	1	1	2	2	2	0.69 ± 0.03	0.218 ± 0.02	0.70 ± 0.03
3	1	2	2	1	1	2	0.76 ± 0.05	0.287 ± 0.01	0.66 ± 0.02
4	1	2	2	2	2	1	0.83 ± 0.09	0.288 ± 0	0.60 ± 0.04
5	2	1	2	1	2	1	0.74 ± 0.07	0.185 ± 0	0.42 ± 0.03
6	2	1	2	2	1	2	0.83 ± 0.06	0.182 ± 0.01	0.60 ± 0.05
7	2	2	1	1	2	2	0.74 ± 0.05	0.178 ± 0.01	0.46 ± 0
8	2	2	1	2	1	1	0.72 ± 0.04	0.203 ± 0.01	0.57 ± 0.03

表 6 交互作用正交实验方差分析表

Table 6 ANOVA table of $L_8(2^7)$ for the interactive effect between Cu, Zn and Pb on enzyme activities

变异来源	自由度	差方和			显著性		
		转化酶	脲酶	碱性磷酸酶	转化酶	脲酶	碱性磷酸酶
Cu	1	0	0.006	0.051	$P < 0.05$		$P < 0.05$
Zn	1	0.001	0.004	0.003		$P < 0.05$	$P < 0.05$
Cu × Zn	1	0.012	0.003	0.004		$P < 0.10$	$P < 0.05$
Pb	1	0.002	0	0.005			$P < 0.05$
Cu × Pb	1	$1.250\text{E}-5$	$2.112\text{E}-5$	0.018			$P < 0.05$
Zn × Pb	1	0	$6.125\text{E}-6$	0.001			
误差	1	0.005	0	0			
总计	7						



不同小写字母表示各处理水平之间在 0.05 水平下差异显著。下同

图 1 3 种土壤酶活性随 Cu 含量的变化

Figure 1 Comparison of effect of Cu in soil on the three soil enzyme activities

微降低;当 Cu 浓度从 $100\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 增加到 $400\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,酶活性显著降低。

图 2 展示的是添加 Zn 后 3 种水解酶活性表现出的不同变化规律。在 Zn 的浓度为 $500\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,转

化酶活性和碱性磷酸酶活性均比对照样品酶活性降低,分别是对照样品酶活性的 97%和 91%,而脲酶活性有所增加,是对照样品的 107%。首先,低浓度的 Zn 抑制转化酶活性,随后又表现出激活特性,当 Zn 浓度从 $300\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 增加到 $500\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,酶活性有缓慢的降低;脲酶活性表现出不同的变化趋势,从最初增加到降低,然后 Zn 浓度从 $300\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 增加到 $500\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,酶活性无明显变化。通常 Zn 对碱性磷酸酶活性表现出抑制作用。Zn 对转化酶活性和脲酶活性的强化效应可能与它们是金属酶有关,并且该金属是 $\text{Zn}^{[3]}$ 。

图 3 描述的是 3 种土壤水解酶活性对添加的外源 Pb 的响应。总体看,在 Pb 浓度为 $500\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,转化酶活性与对照样品相同,脲酶活性比对照样品升高,而碱性磷酸酶活性降低,是对照样品酶活性的 87%。在低浓度时,Pb 抑制转化酶活性,激活脲酶活性。在浓度从 $35\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 增加到 $500\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,转化酶活性随 Pb 浓度增加而降低,而随后转化酶活性升

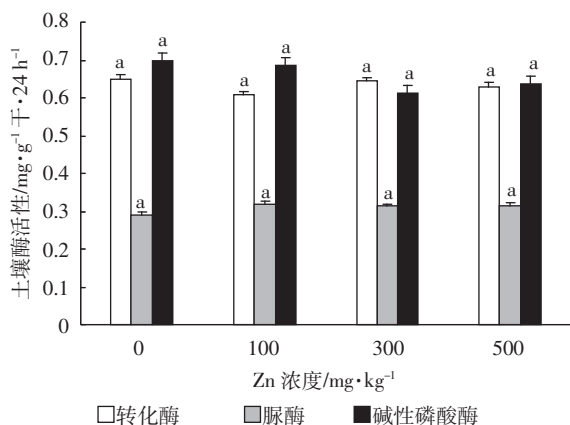


图2 3种土壤酶活性随Zn含量的变化

Figure 2 Comparison of effect of Zn in soil on the three enzyme activities

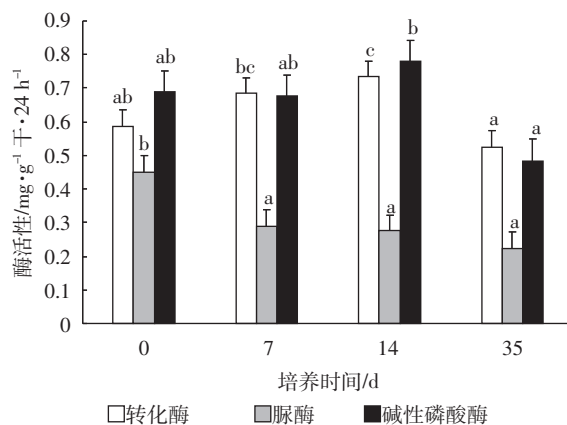


图4 3种土壤酶活性随培养时间的变化

Figure 4 Comparison of effect of incubation time on the three enzyme activities

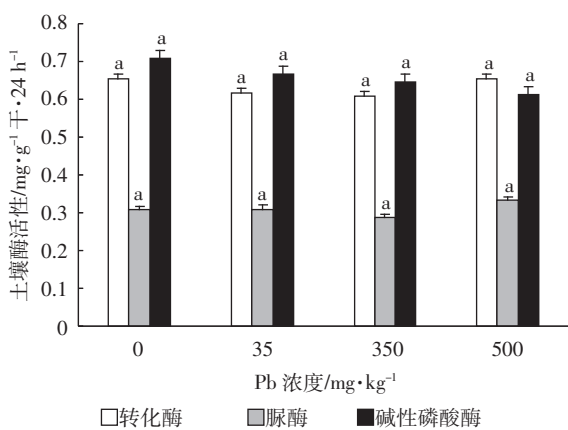


图3 3种土壤酶活性随Pb含量的变化

Figure 3 Comparison of effect of Pb in soil on the three enzyme activities

高;脲酶活性随Pb浓度增加表现出不同的变化规律,当Pb浓度从35 mg·kg⁻¹增加到350 mg·kg⁻¹时,酶活性降低,从350 mg·kg⁻¹增加到500 mg·kg⁻¹时,酶活性增加;Pb则是碱性磷酸酶活性的抑制剂。

不同的培养时间对酶活性也有一定的影响(图4)。在7 d到35 d时,随培养时间的延长,转化酶活性和碱性磷酸酶活性表现出相同的变化趋势,即酶活性先升高,后降低。对脲酶活性而言,在第7 d时有显著降低,随后随时间延长缓慢降低。

水解酶活性与所添加的外源污染物量之间的多元回归方程(式1~式3)显示的信息与以上分析结果类似。从碱性磷酸酶活性与各污染因素添加量之间的多元回归方程可见,Cu、Zn、Pb的回归系数分别为-2.152、-0.451及-0.831,各因素对酶活性均表现为抑制作用,并且对酶活性影响的顺序是Cu>Pb>Zn。另

外,Zn和Pb对脲酶活性表现出激活作用,而Zn对转化酶活性几乎没有影响,这些结论与以前的研究成果一致^[12-13],同时与方差分析的结果相符。

$$Y_1 = 0.737 - 1.038(\text{Cu}^{2+}) - 0.015(\text{Zn}^{2+}) + 0.058(\text{Pb}^{2+}) - 0.003(\text{time}) \quad (\text{式 } 1)$$

$$Y_2 = 0.433 - 1.083(\text{Cu}^{2+}) + 0.097(\text{Zn}^{2+}) + 0.121(\text{Pb}^{2+}) - 0.005(\text{time}) \quad (\text{式 } 2)$$

$$Y_3 = 0.939 - 2.152(\text{Cu}^{2+}) - 0.451(\text{Zn}^{2+}) - 0.831(\text{Pb}^{2+}) - 0.007(\text{time}) \quad (\text{式 } 3)$$

式中:Y₁、Y₂、Y₃分别代表转化酶、脲酶和碱性磷酸酶活性。

3 讨论

复合重金属对土壤酶活性的影响早有报道^[12,14]。本研究发现,与其他污染物相比,Cu可明显抑制土壤水解酶活性,并且抑制程度随金属Cu的含量增加而增大。Zn对转化酶活性和脲酶活性没有明显作用,不过Zn浓度为100 mg·kg⁻¹时可提高脲酶活性。然而,随着添加Zn量的增加碱性磷酸酶活性受到抑制。Cu、Zn和Pb对碱性磷酸酶活性均表现出抑制作用。重金属抑制土壤酶活性的机理有几种方式,包括使酶的催化活性基团失活、使蛋白质变性以及与那些形成酶-底物复合物所必需的金属离子竞争等^[15]。Wang等^[16]发现土壤磷酸酶活性与金属Cu之间呈显著的负相关关系。Khan等^[17]指出重金属可与酶的巯基反应,形成金属-硫化物等同物进而抑制和/或使酶活性失活。抑制剂可通过改变酶的分子结构进而抑制脲酶活性^[18]。另外一些学者研究认为当重金属含量达到2000 mg·kg⁻¹时,脲酶活性可完全消失^[19]。Zeng等^[10]也指出,通

常在特定的环境条件下,某些元素的含量超过某一范围时会对植被和微生物带来负面效应。

另外,不同种类的酶对重金属含量变化带来的响应也不同。这可能取决于酶的灵敏度、酶结构上的抑制以及季节影响。同时,土壤因素,如 pH 值、土壤有机质含量和粘土矿物成分也会有一定的影响^[9,15,20-22]。Wyszkowska 等^[19]指出土壤酶活性对重金属影响的灵敏度排序是脱氢酶>脲酶>碱性磷酸酶。当重金属进入土壤,它们可以改变土壤 pH 值,一般是导致土壤酸化。Renella 等^[23]认为在碱性土壤中,酸性磷酸酶活性更易受影响,而碱性磷酸酶活性在酸性土壤中更易受影响。除此之外,重金属抑制土壤酶活性的机理可能是钝化催化活性基团,与那些可以形成酶-底物复合物的重金属离子竞争,或者是使蛋白质成分失活^[24]。

培养时间对 3 种土壤水解酶活性也表现出不同的影响。不过在第 35 d 时所有的土壤酶活性均比第 3 d 时低,这个结果与 Naidu 等^[25]的结论一致,即随着重金属在土壤中时间的延长,重金属的生物可利用性降低。因为重金属的生物利用率是土壤酶活性的主要来源,尤其是对土壤微生物和植物^[26]。

当 3 种重金属同时存在时,他们对酶活性影响的强度并不是他们单独存在时对酶活性影响程度之和^[12,16],这可能是与同一个实验中的 3 种重金属之间发生了相互作用有关^[26]。

土壤中重金属的主要来源有污水灌溉、工业废弃物堆放、城市固体垃圾堆放以及大气沉降等。刘树庆^[27]发现在保定市污水灌溉的农田中 Zn、Cu、Pb 和 Cd 的含量非常高,并且随着持续的污水灌溉金属含量一直在增加。另外,由于土壤存在多种重金属复合污染,其中种植的蔬菜也已经被污染^[12]。在该研究中,很少有人指出土壤中 Cu、Zn、Pb 的含量已接近污染的水平。

有交互作用的实验结果显示,3 种重金属复合效应对碱性磷酸酶活性影响最显著,尤其是 Cu×Pb,其次是 Cu×Zn。不过这些影响都不及 Cu 单独存在时显著。Wyszkowska 等^[19]曾有过类似的报道,他发现当 Cu 与其他重金属(如 Zn、Pb、Cd 和 Cr)同时存在时,它对土壤酶活性的抑制作用比它单独存在时弱。对于此现象,其他解释是当 2 种重金属同时作用时(Cu×Zn, Cu×Pb),Zn 或 Pb 对土壤酶活性有保护作用^[12]。与 Zn、Pb 的自主效应比较,两者的复合效应降低了,这说明它们对碱性磷酸酶活性的影响具有拮抗作用。尽管 Cu 或 Zn 对转化酶活性有轻微影响并且没有统计显著性,不过它们的复合效应影响增加了,这说明在

它们的二元系统中存在协同效应^[13]。不过,二元系统对碱性磷酸酶活性的抑制作用没有它们单独存在时显著,这可能是由于二者之间存在负的协同抑制效应^[12]。

总之,添加的 Cu、Zn、Pb 对研究的 3 种土壤水解酶活性均呈现不同的影响。土壤酶活性被抑制或激活的程度随重金属种类及其浓度以及土壤酶种类的不同而有差异。一些学者^[7-8,12]报道土壤酶受到抑制或激活的程度顺序与众多因素有关,包括重金属种类、重金属浓度、分析的土壤酶种类;溶液中重金属与土壤酶官能团之间的反应;重金属之间的反应;土壤的理化性质,如 pH 值、阳离子交换量、有机质含量,以及粘土矿物种类和含量等。这些过程可能导致土壤中不同重金属对土壤酶活性抑制或激活效应的不同。这些结果与其他的一些将土壤酶活性作为土壤重金属污染指示剂的研究结论一致^[28]。

4 结论

以正交实验设计方案为基础的该研究证实了土壤中添加的外源重金属 Cu、Zn、Pb,不管是三者的复合作用还是两两之间的相互作用,都对土壤水解酶活性产生了影响。

(1)当 Cu、Zn、Pb 3 种重金属同时存在土壤样品中时,金属 Cu 对 3 种土壤水解酶活性的抑制作用较其他 2 种金属显著,对碱性磷酸酶抑制作用的排序是 Cu>Zn>Pb。

(2)考虑 3 种土壤水解酶,在本研究中碱性磷酸酶活性对 3 种重金属的交互作用影响反应最敏感,尤其是 Cu×Pb,因此可以考虑将碱性磷酸酶活性作为土壤重金属 Cu 污染程度的指示剂。

参考文献:

- [1] Trasar-Cepeda C, Leiros S S, Gil-Sotres F. Limitations of soil enzyme as indicators of soil pollution[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32: 1867-1875.
- [2] Lagomarsino A, Mench M, Marabottini R. Copper distribution and hydrolase activities in a contaminated soil amended with dolomitic limestone and compost[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2011, 74: 2013-2019.
- [3] Huang Q, Shindo H. Effects of copper on the activity and kinetics of free and immobilized acid phosphatase[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32: 1885-1892.
- [4] Sinsabaugh R L, Antibus R K, Linkins A E. An enzymic approach to the analysis of microbial activity during plant litter decomposition[J]. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 1991, 34: 43-54.
- [5] Dick R P. Soil enzyme activities as indicators of soil quality[J]. *Defining*

- Soil Quality for A Sustainable Environment*, 1994, 35: 107–124.
- [6] Liu J, Xie J M, Chu Y F, et al. Combined effect of cypermethrin and copper on catalase activity in soil[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2008 (8): 327–332.
- [7] Gao Y, Zhou P, Mao L, et al. Assessment of effects of heavy metals combined pollution on soil enzyme activities and microbial community structure: Modified ecological dose response model and PCR–RAPD[J]. *Environmental Earth Sciences*, 2010, 60: 603–610.
- [8] 徐冬梅. 土壤酸性磷酸酶性质及汞、铜、锌对其影响的机理研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2003.
XU Dong-mei. Acid phosphatase and its interaction with heavy metals, Hg(II), Cu(II), Zn(II) [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2003. (in Chinese)
- [9] 季轶群, 王子芳, 高明, 等. 重金属 Cu、Zn、Pb 复合污染对紫色土壤酶活性的影响[J]. 中国农学通报, 2010, 26(6): 293–296.
JI Yi-qun, WANG Zi-fang, GAO Ming, et al. Effects of Cu, Zn and Pb compound pollution of heavy metals on purple soil enzyme activities[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(6): 293–296. (in Chinese)
- [10] Zeng L S, Liao M, Chen C L, et al. Effects of lead contamination on soil enzymatic activities, microbial biomass, and rice physiological indices in soil–lead–rice (*Oryza sativa* L.) system[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2007, 67: 67–74.
- [11] 关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京: 农业出版社, 1986.
GUAN Song-yin. Soil enzymes and their research methods[M]. Beijing: Agriculture Press, 1986. (in Chinese)
- [12] Belyaeva O N, Haynes R J, Birukova O A. Barley yield and soil microbial and enzyme activities as affected by contamination of two soils with lead, zinc or copper[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2005, 41: 85–94.
- [13] Yang Z X, Liu S Q, Zheng D W, et al. Effects of cadmium, zinc and lead on soil enzyme activities[J]. *Journal of Environmental Science*, 2006(6): 1135–1141.
- [14] Lan W G, Wong M K, Chen N, et al. Orthogonal array design as a chemometric method for the optimization of analytical procedures (Part 5). Three-level design and its application in microwave dissolution of biological samples[J]. *Analyst*, 1995, 120: 1115–1124.
- [15] Gianfreda L, Bollag J M. Influence of natural and anthropogenic factors on enzyme activity in soil[C]// Stosky G, Bollag J M. Soil biochemistry, New York: Marcel Dekker, 1996.
- [16] Wang Y P, Shi J Y, Wang H, et al. The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2007, 67: 75–81.
- [17] Khan S, Cao Q, Hesham A E L, et al. Soil enzymatic activities and microbial community structure with different application rates of Cd and Pb[J]. *Journal of Environmental Science*, 2007, 19: 834–840.
- [18] Wittekind E, Werner M, Reinicke A, et al. A microtiter–plate urease inhibition assay–sensitive rapid and cost–effective screening for heavy metals in water[J]. *Environmental Technology*, 1996, 17: 597–603.
- [19] Wyszowska J, Kurcharski J, Lajszner W. The effects of copper on soil biochemical properties and its interaction with other heavy metals[J]. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2006, 15: 927–934.
- [20] Baath E. Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review)[J]. *Water, Air and Soil Pollution*, 1989, 47: 335–379.
- [21] 杨志新, 刘树庆. Cd、Zn、Pb 单因素及复合污染对土壤酶活性的影响[J]. 土壤与环境, 2000(1): 15–18.
YANG Zhi-xin, LIU Shu-qing. Effect of single element and compound pollution of Cd, Zn and Pb on soil enzyme activities[J]. *Soil Environmental Science*, 2000(1): 15–18. (in Chinese)
- [22] Shen G Q, Lu Y T, Zhou Q X, et al. Interaction of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals on soil enzyme[J]. *Chemosphere*, 2005, 61: 1175–1182.
- [23] Renella G, Ortigoza A L R, Landi L, et al. Additive effects of copper and zinc on cadmium toxicity on phosphatase activities and ATP content of soil as estimated by the ecological dose (ED_{50})[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35: 1203–1210.
- [24] Hemida S K, Omar S A, Abdel-Mallek A Y. Microbial populations and enzyme activity in soil treated with heavy metals[J]. *Water, Air and Soil Pollution*, 1997, 95: 13–22.
- [25] Naidu R, Kookana R S, Rogers S, et al. Bioavailability of metals in the soil–plant environment and its potential role in risk assessment[C]// Naidu R, Gupta V V S R, Rogers S, et al. Bioavailability toxicity and risk relationship in ecosystems. Enfield, New Hampshire: Science Publishers, 2003: 46–81.
- [26] Karaca A, Camci S, Turgay O C, et al. Effect of heavy metals on soil enzyme activities[C]// Sherameti I, Varma A. Soil heavy metals, soil biology. Berlin: Springer-Verlag, 2010, 19: 237–250.
- [27] 刘树庆. 保定市污灌区土壤的 Pb、Cd 污染与土壤酶活性关系研究[J]. 土壤通报, 1996, 33(2): 175–182.
LIU Shu-qing. The relation between soil Pb, Cd and soil enzyme activities in sewage irrigation area of Baoding[J]. *Journal of Soil Science*, 1996, 33(2): 175–182. (in Chinese)
- [28] 滕应, 黄昌勇, 龙健, 等. 铅锌银尾矿污染区土壤酶活性研究[J]. 中国环境科学, 2002, 22: 551–555.
TENG Ying, HUANG Chang-yong, LONG Jian, et al. Studies on soil enzymatic activities in areas contaminated by tailings from Pb, Zn, Ag mine[J]. *China Environmental Science*, 2002, 22: 551–555. (in Chinese)