

# 土壤锆污染对土壤酶活性的生态毒理效应<sup>\*</sup>

林匡飞<sup>1</sup> 徐小清<sup>2</sup> 郑利<sup>2</sup> 邵志慧<sup>3</sup> 项雅玲<sup>3</sup>

(1 华东理工大学危险化学物质风险评价与控制研究中心, 上海 200237)

(2 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

(3 农业部环境质检中心, 武汉 430070)

**摘要** 通过室内培养和盆栽试验, 研究了土壤添加锆(Ge)对黄棕壤过氧化氢酶、脱氢酶、脲酶、碱性磷酸酶、转化酶的生态毒理效应。结果表明, 在土壤 Ge 含量 2~200 mg kg<sup>-1</sup> 范围, 土壤 Ge 对脱氢酶、碱性磷酸酶、转化酶活性抑制作用不明显。土壤 Ge 对土壤过氧化氢酶和脲酶活性有明显抑制作用, 脲酶受 Ge 的抑制作用最强。土壤 Ge 含量与脲酶活性之间具有显著负相关, 脲酶抑制率可作为 Ge 生态风险评价的一项生物指示物。

**关键词** Ge 污染; 酶活性; 抑制率; 生态毒理效应; 生物指示物

**中图分类号** X132 **文献标识码** A

锆资源的开发和利用, 特别是在电子工业和医学领域的广泛应用, 使锆的环境污染问题愈来愈受关注。近年来, 计算机和通讯等高科技的高速发展, 电子垃圾等含锆废物的增加, 锆和含锆废物对水体和土壤及生态影响倍受人们关注。锆和含锆废物对土壤-植物系统酶的生态毒理效应和敏感指标物的研究, 是新化学物质生态风险评价的重要内容。土壤酶是最活跃的有机物, 国内外许多学者对 Cu、Zn、Pb、Cd、Hg、As 等重金属对土壤酶活性影响进行了广泛的研究<sup>[1-13]</sup>。但土壤锆污染对土壤酶活性影响的研究尚未见报道。在复杂的土壤体系中, 酶系统与不同类型的土壤胶体及污染物的相互作用机制及其对污染物形态、稳定性和生物有效性的影响如何, 有待进一步研究。本研究通过土壤锆污染对土壤酶活性影响的研究, 探讨土壤锆污染对酶的生态毒理效应和敏感标指物, 为土壤锆污染的生态风险评价和管理提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试土壤和材料

试验土壤取自湖北省农业科学院试验田黄棕壤土, 新鲜土样去除植物残体、砾石, 过 2 mm 孔筛, 置于塑料袋内, 放于冰箱内 4℃ 保存备用。土壤理化

性状: pH 6.46, 有机质 24.11 g kg<sup>-1</sup>, 全氮 1.06 g kg<sup>-1</sup>, 全磷 1.62 g kg<sup>-1</sup>, 全钾 15.8 g kg<sup>-1</sup>, CEC 11.23 c mol kg<sup>-1</sup>, 碱解 N 85.2 mg kg<sup>-1</sup>, 速效 P 55.2 mg kg<sup>-1</sup>, 速效 K 151.2 mg kg<sup>-1</sup>, 有效硅 142.5 mg kg<sup>-1</sup>, 全 Ge 0.824 mg kg<sup>-1</sup>。氧化锆(GeO<sub>2</sub>) 为光谱纯, 由中国有色金属研究总院提供, 用时按纯度配制成相应浓度。

### 1.2 室内酶培养试验

将过 2 mm 筛的供试土壤从 4℃ 冰箱内取出, 置于 25℃ 的恒温培养箱预培养 7 d, 称取相当于 100 g 烘干土样的新鲜土样于培养皿中, 加入不同浓度的 Ge 溶液, 分别调整为 CK、10、30、50、100 mg kg<sup>-1</sup>, 搅拌均匀, 调整土壤含水量为田间最大持水量的 60%, 每处理 4 次重复, 在 28±1℃ 的恒温恒湿条件下培养 6 周, 在不同时期分别取样, 按 S 型路线采集混合土样, 装入无菌纸袋, 风干进行酶的测定。

### 1.3 盆栽试验

设置 Ge 浓度分别为 CK、2、4、8、10、20、50、100、150、200 mg kg<sup>-1</sup>。大豆盆栽试验, 重复 3 次, 大豆收割期分别于各盆内取土样, 按 S 型路线采集深度为 0~5 cm 混合土样, 装入无菌纸袋, 尽快带回实验室, 风干进行酶的测定。

### 1.4 土壤酶活性的测定方法

取风干土样(过 2 mm 孔筛), 选择 5 种对土壤生

\* 湖北省科技攻关计划引导项目(2001AA201C1)资助

作者简介: 林匡飞(1963~), 男, 浙江宁波人, 博士, 副教授, 主要从事污染生态学和生态风险研究。E-mail: kflin@ecust.edu.cn, Tel: 021-64252978

收稿日期: 2004-03-08; 收到修改稿日期: 2004-08-12

化过程有重要作用并估计可能对 Ge 敏感的酶, 5 种酶为脲酶、过氧化氢酶、脱氢酶、磷酸酶、转化酶, 进行测定; 酶测定采用关松荫专著所述方法<sup>[5]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 土壤添加 Ge 对土壤酶活性的影响

**2.1.1 Ge 对土壤脲酶活性影响** 土壤恒温恒湿条件下培养 3 周和 6 周, 结果表明(图 1), 当土壤 Ge 浓度为  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  时, 脲酶活性有明显增加; 当 Ge 浓度  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  时, 产生轻微抑制。当 Ge 浓度大于  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  时, 抑制加剧。由此可见, 在室内培养条件下, 低浓度 Ge 对脲酶活性有刺激作用; 当浓度较高时, 产生抑制作用。盆栽试验与室内培养试验结果(图 2) 趋势比较一致, 在土壤 Ge 含量  $2 \sim 200 \text{ mg kg}^{-1}$  范围, 低浓度 Ge ( $2 \sim 8 \text{ mg kg}^{-1}$ ) 对土壤脲酶活性有刺激作用, 随着 Ge 浓度升高, 总体呈抑制趋势。

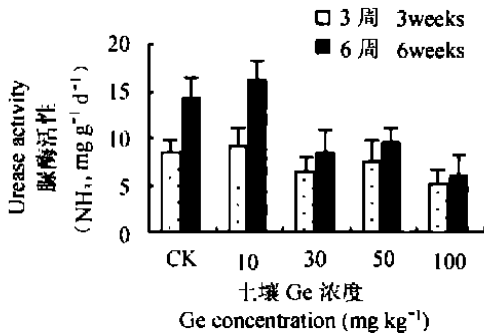


图 1 Ge 对土壤脲酶活性的影响

Fig. 1 Effect of Ge on soil urease activity

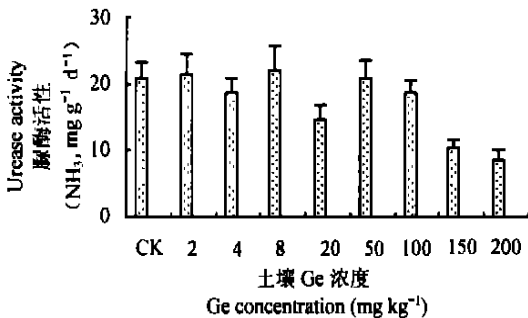


图 2 Ge 对盆栽土壤脲酶活性的影响

Fig. 2 Effect of Ge on soil urease activity in pot culture

**2.1.2 Ge 对土壤过氧化氢酶活性的影响** 室内培养试验结果表明(图 3), 当土壤 Ge 浓度为  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  时, 过氧化氢酶活性有明显增加, 比对照

增加 28.3%; 当 Ge 浓度  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  时, 产生轻微抑制。当 Ge 浓度大于  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  时, 抑制加剧。当 Ge 浓度  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  时, 培养 3 周后过氧化氢酶活性抑制明显加剧, 而培养 6 周后过氧化氢酶活性有轻微增加。

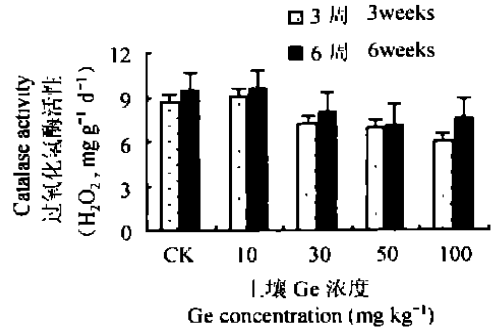


图 3 Ge 对土壤过氧化氢酶活性的影响

Fig. 3 Effect of Ge on soil catalase activity

盆栽试验结果表明(图 4), 在土壤 Ge 含量  $2 \sim 200 \text{ mg kg}^{-1}$  范围, 低浓度 Ge 对过氧化氢酶活性有明显刺激作用。Ge 浓度大于  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  时, 酶活性开始呈抑制趋势。当 Ge 浓度  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  时, 抑制最大。当 Ge 浓度  $200 \text{ mg kg}^{-1}$  时, 略有上升。盆栽试验与室内培养试验结果总趋势一致, 低浓度 Ge 对过氧化氢酶活性有刺激作用, 高浓度产生抑制作用。

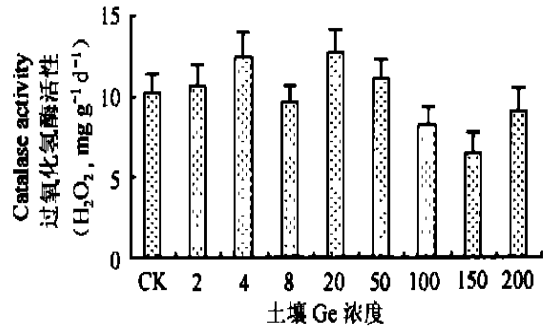


图 4 Ge 对盆栽土壤过氧化氢酶活性的影响

Fig. 4 Effect of Ge on soil catalase activity in pot culture

**2.1.3 Ge 对土壤磷酸酶活性的影响** 土壤恒温恒湿条件下培养 3 周和 6 周, 土壤磷酸酶活性如图 5。在培养 3 周后 Ge 对土壤磷酸酶活性的抑制变化不大。而培养 6 周后, 土壤 Ge 浓度为  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  时, 土壤磷酸酶活性明显增加。当 Ge 浓度  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  时, 产生轻微抑制, 此后随着 Ge 浓度增加, Ge 对土壤磷酸酶活性的抑制变化不大, 基本一致。盆栽试验结果表明(图 6), 低浓度 Ge ( $4 \sim 50 \text{ mg kg}^{-1}$ ) 对土壤磷酸酶活性有轻微抑制作用。此后随着 Ge

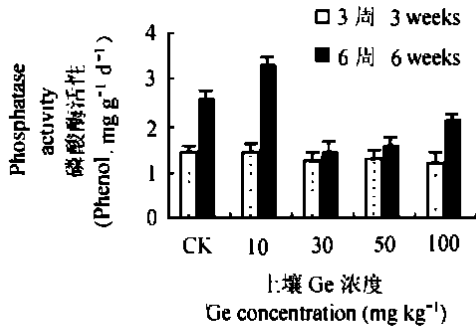


图5 Ge对土壤磷酸酶活性的影响

Fig. 5 Effect of Ge on soil phosphatase activity

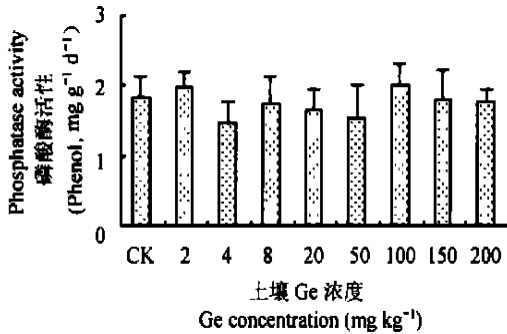


图6 Ge对盆栽土壤磷酸酶活性的影响

Fig. 6 Effect of Ge on soil phosphatase activity in pot culture

浓度增加, Ge对土壤磷酸酶活性有轻微刺激作用, 当Ge浓度 $100 \text{ mg kg}^{-1}$ 时, 产生刺激作用最大。

**2.1.4 Ge对土壤转化酶活性的影响** Ge对土壤转化酶活性影响(图7)表明, 在实验3周后Ge浓度 $0 \sim 50 \text{ mg kg}^{-1}$ 范围内, 有抑制作用,  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ 时有刺激作用。6周试验后, 呈现两个抑制谷, 浓度分别出现在 $30 \text{ mg kg}^{-1}$ 和 $100 \text{ mg kg}^{-1}$ 处; 呈现两个刺激峰, 浓度分别出现在 $10 \text{ mg kg}^{-1}$ 和 $50 \text{ mg kg}^{-1}$ 。

**2.1.5 Ge对土壤脱氢酶活性的影响** 由图8表明, 3周后Ge对土壤脱氢酶活性影响不大。6周后, 低浓度Ge( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ )时, 产生刺激作用, 随后随着

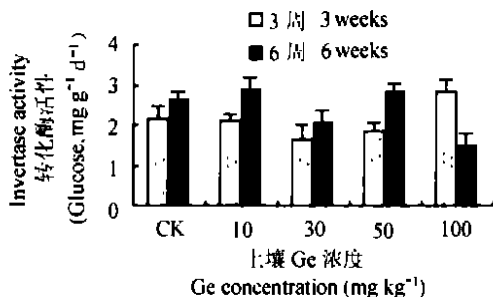


图7 Ge对土壤转化酶活性的影响

Fig. 7 Effect of Ge on soil invertase activity

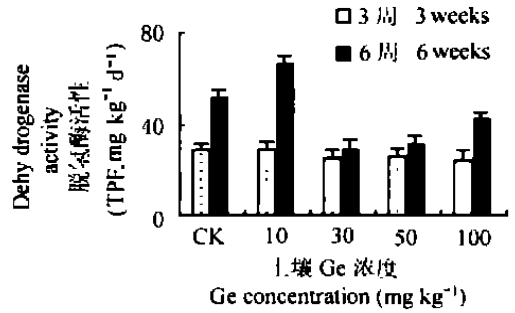


图8 Ge对土壤脱氢酶活性的影响

Fig. 8 Effect of Ge on soil dehydrogenase activity

Ge浓度增加, 基本保持在对照组以下的低水平不变, 当Ge浓度 $100 \text{ mg kg}^{-1}$ 时, 有增加趋势, 但酶活性仍低于对照。

## 2.2 土壤Ge含量与土壤酶效应的相关分析和临界值

在土壤Ge含量 $2 \sim 200 \text{ mg kg}^{-1}$ 范围, 对土壤Ge浓度与土壤转化酶、过氧化氢酶、脱氢酶、磷酸酶活性回归分析结果表明, 这些酶活性的抑制率与土壤Ge含量无相关性。土壤Ge浓度与土壤脲酶活性存在显著的相关性, 表明随着土壤Ge浓度升高, 土壤脲酶活性随之下降, 回归方程为 $Y(\text{脲酶活性}) = 1.62X(\text{土壤Ge含量}) + 0.27$ ,  $n = 10$ ,  $r = 0.83$ 。按照回归方程计算得临界值 $EC_{25}$ 值为 $88.2 \text{ mg kg}^{-1}$ ,  $EC_{50}$ 值为 $182 \text{ mg kg}^{-1}$ 。

## 3 讨论

土壤成分中酶是最活跃的有机成分之一, 驱动着土壤的代谢过程, 对土壤圈中养物质的循环和污染物质的净化起着重要作用<sup>[5]</sup>。

土壤脲酶能促进土壤中有有机化合物尿素分子酰胺键的水解, 生成的氨是植物氮素营养来源之一; 磷酸酶能酶促各种有机磷化合物的分解, 为植物生长提供有效磷素。它们是评价土壤肥力状况的两个重要水解酶<sup>[5]</sup>。而转化酶与土壤有机碳的转化有关。过氧化氢酶是生物细胞的一类保护酶。脱氢酶存在于微生物细胞内, 是典型的胞内酶, 其活性的大小直接反映土壤微生物的数量和活性<sup>[6]</sup>。许多研究表明, 土壤酶活性对重金属的抑制或激活较为敏感, 是反映重金属污染程度的有效指标<sup>[6~10]</sup>。周礼恺等<sup>[11]</sup>提出脲酶、蔗糖酶、磷酸酶等可作为土壤污染水平的指标。Kumar等<sup>[1]</sup>将质量分数为 $50 \text{ mg kg}^{-1}$ 或 $25 \mu\text{mol g}^{-1}$ 的不同金属离子添加到土壤中, 脲酶

活性均受到抑制,作用的顺序为:  $\text{Ag}^+ > \text{Hg}^{2+} > \text{Au}^{3+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cu}^+ > \text{Co}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{As}^{3+}$ 、 $\text{Pb}^+$ 、 $\text{Cr}^{3+}$ 、 $\text{Ni}^{2+} >$  其他离子。胡荣桂<sup>[5]</sup>的试验发现,向红壤中投入 Cd、Pb,当 Cd 质量分数为  $30 \text{ mg kg}^{-1}$ , Pb 为  $750 \text{ mg kg}^{-1}$  时对脲酶有显著抑制作用,而低浓度 Cd 和 Pb 则有激活作用。

Lebedeval<sup>[2]</sup>发现质量分数为  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  的 Cd 不会引起脲酶活性明显降低,而  $100 \sim 150 \text{ mg kg}^{-1}$  的 Zn 和  $80 \sim 100 \text{ mg kg}^{-1}$  的 Pb 则使脲酶活性显著降低。沈桂琴等<sup>[12]</sup>的研究显示 Hg、Cd、Pb 对土壤脲酶、转化酶、碱性磷酸酶和蛋白酶活性有明显的抑制作用,而 Cr 具有激活作用,脲酶的反应最敏感;他们提出重金属的临界质量分数, Hg 为  $1.5 \text{ mg kg}^{-1}$ , Cd 为  $3.0 \text{ mg kg}^{-1}$ , Pb 为  $500 \text{ mg kg}^{-1}$ ; 同时发现“抗性酶活性”现象,认为当重金属在土壤达到一定质量分数时,大部分微生物死亡,而一小部分微生物在有毒物质污染下能生存下来,自行繁殖,从而产生抗性酶活性,表观上酶活性值降低后又增大,有时还会出现多个抗性峰。吴家燕<sup>[4]</sup>对水稻根系酶活性的研究也发现类似现象。这与本文在土壤 Ge 含量  $2 \sim 200 \text{ mg kg}^{-1}$  范围,对酶活性影响结果较一致。

Todorov 等<sup>[3]</sup>认为 Pb 对蛋白酶活性没有影响,而明显激活脲酶活性,抑制淀粉酶。Chandes 等<sup>[7]</sup>发现铜与脱氢酶活性之间关系不密切,认为脱氢酶不能表征土壤铜污染的程度。杨志新等<sup>[13]</sup>发现, Cd、Zn、Pb 对土壤酶活性的抑制效应顺序为  $\text{Cd} > \text{Zn} > \text{Pb}$ ; 在过氧化氢酶、脲酶、碱性磷酸酶、转化酶中,脲酶受重金属的抑制作用最为敏感。

本文在土壤 Ge 含量  $2 \sim 200 \text{ mg kg}^{-1}$  范围,研究结果 Ge 含量和土壤脲酶活性抑制率之间有极显著的相关性,这与有关文献报道的重金属(Cu、Zn、Pb、Cd)对土壤脲酶活性抑制率之间有极显著的相关性较一致。而土壤 Ge 含量与磷酸酶活性抑制率之间相关不显著,这与有关文献报道的重金属(Cu、Zn、Pb、Cd)对磷酸酶抑制率之间显著相关不一致。室内实验还对土壤过氧化氢酶、转化酶、脱氢酶抑制率与土壤 Ge 浓度进行了试验,由于两者并未有明显的线性关系,盆栽试验只测试了过氧化氢酶,其他未测试。许多研究表明,土壤酶是以有机无机复合体吸附在土壤粘粒上,土壤对酶具有一定的保护作用;同时污染物进入土壤后,也很快会受到土壤有机质的吸附、固定和螯合,阳离子交换量、粘粒含量也会对其有效性即生物毒性产生重要影响<sup>[10]</sup>。Zantua 等<sup>[14]</sup>研究发现,土壤具有保护酶的能力,且这种保

护容量常是一相对恒定的值。从以上研究表明,土壤 Ge 浓度增大对酶活性的抑制作用来看,土壤酶是一个生物缓冲体系,可以调整对外界污染物的抵御能力。此外,由于 Ge 与 Si 属同属元素,目前对于 Ge 的毒性了解不够,一般土壤含量为  $0.5 \sim 1.0 \text{ mg kg}^{-1}$ ,最高土壤含量为  $5 \text{ mg kg}^{-1}$ 。因此本试验设计最高浓度为  $200 \text{ mg kg}^{-1}$ ,更高浓度  $200 \sim 1000 \text{ mg kg}^{-1}$  对土壤过氧化氢酶、转化酶、脱氢酶如何抑制,还待下一步试验。

## 4 结 论

土壤添加 Ge 对土壤酶活性抑制率试验表明,在土壤 Ge 含量  $2 \sim 200 \text{ mg kg}^{-1}$  范围,对土壤过氧化氢酶和脲酶活性有抑制作用,脲酶受 Ge 的抑制作用最为敏感。试验发现土壤 Ge 对脱氢酶、碱性磷酸酶、转化酶有“抗性酶活性”现象,表观上酶活性值降低后又增大,有时还会出现多个抗性峰。在土壤 Ge 含量  $2 \sim 200 \text{ mg kg}^{-1}$  范围,土壤 Ge 含量对土壤酶活性抑制率试验表明,土壤 Ge 含量与土壤过氧化氢酶、脱氢酶、磷酸酶、转化酶活性之间无显著相关性,而与脲酶活性之间具有显著相关性,表明随着土壤 Ge 浓度升高,酶活性抑制率随之增加。按照回归方程计算得临界值  $\text{EC}_{25}$  值为  $88.2 \text{ mg kg}^{-1}$ ,  $\text{EC}_{50}$  值为  $182 \text{ mg kg}^{-1}$ 。

## 参 考 文 献

- [1] Kumar V, Singh M. Inhibition of soil urease activity and nitrification with some metallic cations. *Australian Journal of Soil Research*, 1986, 24(4): 527~ 532
- [2] Lebedeval L A, Lebedev S N, Edmskayua N L. The effect of heavy metals and lime on urease activity podzalic podzalic soil. *Moscow University Soil Science Bulletin*, 1995, 50(2): 68~ 71
- [3] Todorov T S, Dinkov R, Koteva Z H, et al. Effect of lead contamination on the biological properties of alluvial meadow soil. *Pochovoznanie, Agrokimiya*, 1987, 22(5): 33~ 40
- [4] 吴家燕, 夏增禄, 巴音, 等. 土壤重金属污染的酶学诊断——紫色土中的镉、铜、铅、砷对水稻根系过氧化物酶的影响. *环境科学学报*, 1990, 10(1): 73~ 76. Wu J Y, Xia Z L, Ba Y, et al. Enzymological diagnose of soil heavy metal pollution (In Chinese). *Acta Scientiae Circumstantiae*. 1990, 10(1): 73~ 76
- [5] 关松荫. 土壤酶及其研究法. 北京: 农业出版社, 1986, 1~ 13. Guan S Y, ed. *Soil Enzyme and Its Method* (In Chinese). Beijing: Agriculture Press, 1986. 1~ 13
- [6] 褚海燕, 朱建国, 谢祖彬, 等. 稀土元素镧对红壤脲酶、酸性磷酸酶活性的影响. *农业环境保护*, 2000, 19(4): 193~ 195. Chu H Y, Zhu J G, Xie Z B, et al. Effects of lanthanum on urease and

- acid phosphatase activities in red soil( In Chinese). *Agrø-environmental Protection*, 2000, 19(4): 193~ 195
- [ 7 ] Chander K, Brookes P C. Is the dehydrogenase assay invalid as a method to estimate microbial activity in copper-contaminated Soils. *Soil Biol Biochem*, 1991, 23:909~ 915
- [ 8 ] Wilke B M. Effects of single and successive additions of cadmium, nickel and zinc carbon dioxide evolution and dehydrogenase activity in a sandy luvisol. *Biol. Fertil. Soil*, 1991, 11:34~ 37
- [ 9 ] 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. *土壤学报*, 1996, 33( 2): 175~ 182. Liu S Q. Relationship between enzyme activities and soils polluted by lead, cadmium in irrigation areas( In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 1996, 33(2): 175~ 182
- [ 10 ] 和文祥, 陈会明, 冯贵颖. 等. 汞铬砷元素污染土壤的酶检测研究. *环境科学学报*, 2000, 20(3): 338~ 430. He W X, Cheng H M, Feng G Y, *et al.* Study on enzyme index in soils polluted by mercury, chromium and arsenic( In Chinese). *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2000, 20(3): 338~ 430
- [ 11 ] 周礼恺, 张志明, 曹承锦, 等. 土壤的重金属污染与土壤酶活性. *环境科学学报*, 1985, 5(2): 176~ 183. Zhou L K, Zhang Z M, Cao C J, *et al.* Soils polluted by heavy metals and soil enzyme activities( In Chinese). *Acta Scientiae Circumstantiae*, 1985, 5(2): 176~ 183
- [ 12 ] 沈桂琴, 廖瑞章. 重金属、矿物油对土壤酶活性的影响. *农业环境保护*, 1987, 6(3): 24~ 27. Shen G Q, Liao R Z. Effect of heavy metals and mineral oil on soil enzymic activities ( In Chinese). *Agrø-environmental Protection*, 1987, 6(3): 24~ 27
- [ 13 ] 杨志新, 刘树庆. 重金属 Cd、Zn、Pb 复合污染对土壤酶活性的影响. *环境科学学报*, 2001, 21(1): 60~ 63. Effect of compound pollution of heavy metals on soil enzymic activities ( In Chinese). *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2001, 21(1): 60~ 63
- [ 14 ] Zantua MI, Bremner JM. Stability of urease in soils. *Soil Biol. Biochem.* 1977, 9: 135~ 140

## ECØ TOXICOLOGICAL EFFECTS OF Ge-POLLUTION ON SOIL ENZYME ACTIVITIES IN SOIL

Lin Kuangfei<sup>1</sup> Xu Xiaqing<sup>2</sup> Zheng Li<sup>2</sup> Shao Zhihui<sup>3</sup> Xiang Yaling<sup>3</sup>

(1 *Research Center of Risk Assessment and Management on Hazardous Chemicals, East China*

*University of Science and Technology, Shanghai 200237, China*)

(2 *Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China*)

(3 *Agrø-Environmental Monitoring Center of Wuhan, MOA, Wuhan 430070, China*)

**Abstract** Ecø toxicological effects of germanium on activities of catalase, dehydrogenase, urease, phosphatase and invertase in brown-yellow soil were studied by means of indoor culture and pot culture experiments. The results showed that when Ge concentration ranged between 2~ 200 mg kg<sup>-1</sup> in the soil, its inhibiting effect on soil dehydrogenase, phosphatase and invertase was not significant, but quite so the activity of soil catalase and urease; especially the latter. A significant negative relationship between urease activity and Ge concentration of soil could be observed, so it is feasible to use inhibition rate of soil urease as a bio-indicator for ecological risk assessment of Ge pollution in the soil.

**Key words** Germanium pollution; Enzyme activity; Inhibition rate; Ecø toxicological effect; Bio-indicator