

外源镍在土壤中的存在形态及其与土壤酶活性的关系*

蔡信德^{1,2}, 仇荣亮¹, 汤叶涛¹, 方晓航¹, 陈桂珠¹

(1. 中山大学环境科学与工程学院, 广东 广州 510275;

2. 国家环境保护总局华南环境科学研究所, 广东 广州 510655)

摘 要: 采用培养试验方法, 研究了土壤中重金属镍的存在形态及其对5种土壤酶活性的影响。随着土壤外加镍的质量分数增加(100~1 600 mg/kg), 碱性磷酸酶活性和酸性磷酸酶活性均受到较强的抑制, 抑制率分别为15.0%~67.3%、13.9%~85.3%; 脲酶活性抑制率为-1.6%~21.3%, 表现出先激活后抑制的现象; 镍对多酚氧化酶也有抑制作用; 对过氧化氢酶的抑制作用轻微。研究结果表明, 酸性磷酸酶、碱性磷酸酶和脲酶可作为判明土壤镍污染程度的主要生化指标。镍的存在形态与土壤酶活性之间的关联度分析和相关分析证实, DTPA提取的有效态镍与土壤酶活性之间相关性好、关联度大。因此, 以DTPA提取的有效态镍来表征土壤镍的生物有效性是可行的。

关键词: 土壤; 镍; 形态; 土壤酶活性

中图分类号: S154.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) 05-0093-05

土壤酶活性是探讨重金属污染生态效应的有效指标之一^[1], 可有助于判明土壤中重金属污染的程度及其对作物生长的影响^[2]。在不同种类或剂量的重金属元素胁迫下, 相关的数十种土壤酶受到抑制或激活的变化程度因酶类型而异, 且这种变化与土壤的机械组成、有机质含量、pH等有关^[3~5]。目前, 采用土壤酶活性来评价土壤重金属污染生态效应的方法尚有待进一步完善。

植物修复是土壤重金属污染修复的研究热点^[6]。目前, 在已发现的400多种超富集植物中, 镍超富集植物超过300种^[7], 镍污染土壤的植物修复也成为最早投入商业利用的领域^[7,8], 其修复机理以及镍污染的土壤-植物系统生态效应的研究也得到广泛关注。本文通过室内培养试验, 分析水溶性镍添加后土壤镍形态变化及其与土壤酶活性之间的剂量-效应关系, 研究不同形态镍对土壤酶的有效性, 旨在筛选出对镍敏感的土壤酶, 为土壤环境质量标准的修订、土壤质量监测和污染土壤的修复等提供科学依据。

1 实验材料和方法

1.1 土壤

(1) 土壤来源及基本性质

供试土壤为潴育型水稻土, 采自广东省农业科学研究院水稻研究所试验田(耕作层土), 其基本理化性质和重金属含量: pH 6.37, 总氮 1.42 g/kg, 总碳 18.43 g/kg, 总锌 212 mg/kg, 总铜 41.70 mg/kg, 总铅 85.80 mg/kg, 总镍 12.51 mg/kg, 可交换态镍 0.04 mg/kg, 弱专性吸附态镍 0.18 mg/kg, 铁锰氧化物结合态镍(OX-Ni) 0.48 mg/kg, 有机质结合态镍 0.64 mg/kg, 残渣态镍 11.17 mg/kg, 阳离子交换量 1.74 cmol/kg。土壤样品经室内风干, 剔除植物碎片、根系、石子等, 过6目竹筛后备用。

(2) 土壤处理和培养

称取制备好的土壤样品5 kg, 共7份, 分别按镍的质量分数0、100、200、300、400、800和1 600 mg/kg(干质量)加入已研磨成粉末状的NiSO₄·6H₂O。充分混合后, 各加去离子水1 800 mL以保持土壤湿润, 然后置于带盖的小型塑料桶内密封、存放于玻璃网室(常温)进行培养。土壤经12周培养后, 室内风干。每桶取2个分析样品, 过20目和100目尼龙筛, 分装于密封塑料袋内, 备用。

1.2 分析方法

(1) 镍总量及各形态的分析方法^[9,10]

土壤镍总量(T-Ni): 采用浓HNO₃、HClO₄、

* 收稿日期: 2005-02-02

基金项目: 国家863计划资助项目(200-AA-640501-03); 国家自然科学基金资助项目(20177035); 广东省重大科技专项基金资助项目(2004A30308002); 教育部新世纪优秀人才支持计划

作者简介: 蔡信德(1965年生), 男, 博士研究生; 通讯联系人: 仇荣亮; E-mail: eesqrl@zsu.edu.cn

HF 消煮, 原子吸收分光光度计测定。

土壤中镍各形态分析方法: 可交换态 (EX-Ni) 用 1 mol/L MgCl_2 溶液提取, 弱专性吸附态或碳酸盐结合态 (CAB-Ni) 用 1 mol/L NaOAc 溶液提取, 铁锰氧化物结合态 (OX-Ni) 用 0.04 mol/L $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 溶液提取, 有机质结合态 (OM-Ni) 用 0.04 mol/L HNO_3 和 30% H_2O_2 溶液提取, 残渣态 (RES-Ni) 以差减法计算。

有效态采用 0.005 mol/L 的 DTPA 溶液提取, 用 DTPA-Ni 表示。

溶液镍浓度用 Hitachi Z-5000 原子吸收分光光度计测定。

(2) 土壤酶活性的分析方法

土壤中过氧化氢酶 (EC 1.11.1.6)、多酚氧化酶 (EC 1.10.3.1)、脲酶 (EC 3.5.1.5)、碱性磷酸酶 (EC 3.1.3.1) 和酸性磷酸酶 (EC 3.1.3.2) 活性的测定参照文献 [11] 进行。在酶活性的表达单位上作了修改, 具体是: 过氧化氢酶为 1 h 每克土的 0.1 mol/L KMnO_4 的毫升数, 脲酶为 1 h 每 100 g 土 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的毫克数, 多酚氧化酶为 1 h 每 100 g 土的红紫精精毫克数, 碱性磷酸酶和酸性磷酸酶为

1 h 每 100 g 土 P_2O_5 的毫克数。

(3) 其它指标的分析方法^[12]

pH 用酸度计法, 总氮用半微量凯氏法, 总碳用重铬酸钾氧化—油浴加热法, 总锌、总铜、总铅用原子吸收分光光度计法, 阳离子交换量用乙酸铵交换法。

2 结 果

2.1 土壤中镍的形态

土壤中各种形态的镍的统计结果见表 1。

由表 1 可见, 原土中, RES-Ni 占 82.7%。添加镍后, EX-Ni 所占比例随添加量的增大而升高, 当添加量为 1 600 mg/kg 时, EX-Ni 占 T-Ni 的比例达到了 48.4%。CAB-Ni 占 T-Ni 的比例为 16.9% ~ 22.7%, 随添加量增加的变幅较小。OX-Ni 和 OM-Ni 占 T-Ni 的比例分别为 31.6% ~ 13.5%、19.8% ~ 7.5%, 并随添加量的增加而下降。RES-Ni 占 T-Ni 的比例不高, 在 10.3% ~ 24.6%。DTPA-Ni 的变化趋势与 EX-Ni 的变化相似, 其占 T-Ni 的比例在 45.0% ~ 66.6% 之间。

表 1 不同处理的土壤中各种形态镍的比例

Tab.1 The percentage of different nickel fractions in different treated soil

镍添加量 ¹⁾	TOTAL ²⁾	EX-Ni	CAB-Ni	OX-Ni	OM-Ni	RES-Ni	DTPA-Ni
($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)							
0	12.40 ± 2.04	0.8	3.4	5.2	7.9	82.7	4.6
100	102.08 ± 2.63	10.2	16.9	31.6	19.8	21.5	45.0
200	215.40 ± 10.57	15.3	19.8	25.3	15.1	24.6	48.8
300	303.67 ± 27.82	21.8	22.7	24.7	13.5	17.3	56.4
400	423.96 ± 4.59	28.7	18.7	22.1	11.9	18.5	51.0
800	834.74 ± 14.30	33.4	21.5	18.6	9.5	16.9	59.9
1600	1627.24 ± 19.61	48.4	20.3	13.5	7.5	10.3	66.6

注: 1) 设计添加量; 2) 土壤镍的质量分数, 2 次重复的平均值 ± 标准差。

2.2 土壤酶活性

土壤酶活性的分析结果见表 2。抑制率 (The percentage of inhibition, PI) 的计算采用下式^[4]:

$$\text{PI} = \frac{\text{未处理土壤的酶活性} - \text{处理土壤的酶活性}}{\text{未处理土壤的酶活性}} \times 100\%$$

从表 2 看, 随着镍添加量的增加, 镍对碱性磷酸酶和酸性磷酸酶的抑制作用增大, 其抑制率分别为 15.0% ~ 67.3%、13.9% ~ 85.3%。镍添加量为 100 mg/kg 时, 镍对脲酶有激活作用; 随着镍添加量的增加, 脲酶的活性受到抑制。多酚氧化酶的活性则在较高的剂量时受到明显抑制。过氧化氢酶的活性受镍的影响较小。

3 讨 论

3.1 外源镍的形态变化

分析结果表明, 外源镍进入土壤后的存在形态与其添加剂量有较大的关系。镍加入量较低时, 土壤中镍主要以结合程度较高的 OX-Ni 和 OM-Ni 存在, 这是土壤多种组分的共同作用的结果; 当加入量较高时, 镍在土壤中的含量超过土壤自身的缓冲作用能力, 添加镍有一部分还未能进行形态上的转化, 最后以 EX-Ni 的形式表现出来, 故这一形态所占的比例较高。RES-Ni 占的比例不高, 与自然土壤中的 RES-Ni 所占的比例有较大的差异^[9,13], 主

要是由于这一形态的镍存在于矿物晶格中,难以发生代换作用所致。

DTPA-Ni 与各形态 Ni 之间相关分析结果表明, DTPA-Ni 与其它 5 种形态镍的相关系数大小顺序依次是: CAB-Ni (0.939) > EX-Ni (0.843) > OX-Ni (0.447) > OM-Ni (0.021) > RES-Ni (-0.957)。DTPA-Ni 与 CAB-Ni 和 EX-Ni 分别呈极显著 ($P < 0.01$)、显著 ($P < 0.05$) 正相关,与 RES-Ni 为极显著 ($P < 0.01$) 负相关;而与 OX-Ni、OM-Ni 成正相关,但相关不显著 ($P > 0.05$)。因此, DTPA-Ni 主要组成为 EX-Ni 和 CAB-Ni,其它形态(如 OM-Ni)只占很小部分。

3.2 外源镍对土壤酶活性的影响

(1) 土壤酶活性与镍剂量的关系

碱性磷酸酶和酸性磷酸酶属于水解磷酸一酯的酶,无论外加镍量是低还是高,此 2 种酶的活性均受到抑制。从 PI 的变化看,酸性磷酸酶的活性随着土壤中镍的增加而减小的变化较碱性磷酸酶的明显,碱性磷酸酶活性/酸性磷酸酶活性的比率与 Roman 等^[3]的研究结果类似,在 0.16 ~ 0.53 之间。供试土壤 pH 为 6.35,属于微酸性的土壤环境,此条件有利于酸性磷酸酶的形成(包括分泌此酶的微生物)。因此,当外源镍进入土壤后,特别是高剂量时,酸性磷酸酶活性受抑制的程度较碱性磷酸酶大。

脲酶为肽及氨基水解酶,其 α 亚基在双核活性中心键合了 2 个镍原子^[14]。因此,镍在维持脲酶分子结构和脲酶的催化功能方面具有重要作用。当加入土壤中的镍较少(100 mg/kg)时,添加的镍促进了脲酶的合成,对脲酶活性有刺激作用,表现为酶活性增加;但随着镍加入量的增加,对脲酶活性的抑制率增大,表明土壤中高剂量的镍对脲酶的活性有抑制作用。本试验中采用了同一土壤,有机质、pH 和粘粒含量等在不同处理中基本相同,因此,土壤脲酶活性随镍添加量增加而降低的主要原

因,可能与分泌脲酶的微生物在镍胁迫条件下的生理生化功能受到一定程度影响有关。

过氧化氢酶属于氧化还原酶,在土壤中的作用主要是破坏对生物有毒害作用的过氧化氢^[15]。试验结果(表 2)表明,镍对此酶的抑制作用较轻,各处理间酶活性变幅也小,抑制率仅为 0.4% ~ 5.8%。这可能与土壤的驯化过程有关,因为在一个封闭的、含水分较高的条件下,土壤基础呼吸和好气性微生物的活动将会受到影响^[11]。

(2) 土壤酶活性之间的关系

5 种土壤酶活性之间的相关分析表明,在有外源镍存在的土壤中土壤酶活性相互间关系亦有明显的相关性。脲酶与碱性磷酸酶、多酚氧化酶的相关系数(R)分别为 0.937 ($P < 0.01$)、0.865 ($P < 0.01$),达到极显著水平;脲酶与酸性磷酸酶之间为显著正相关关系($R = 0.981$, $P < 0.05$)。多酚氧化酶与碱性磷酸酶之间为极显著正相关关系($R = 0.843$, $P < 0.01$);与酸性磷酸酶之间为显著正相关关系($R = 0.884$, $P < 0.05$)。碱性磷酸酶与酸性磷酸酶之间为显著正相关关系($R = 0.938$, $P < 0.05$)。过氧化氢酶与碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、脲酶、多酚氧化酶之间为正相关关系,但相关不显著($P > 0.05$)。

(3) 土壤酶活性与各种形态镍之间的关系

土壤酶活性与各种形态镍的关联度分析结果(表 3)表明: EX-Ni 对碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、脲酶、多酚氧化酶和过氧化氢酶的活性影响最大,其次为 DTPA-Ni,再其次为 CAB-Ni,而 T-Ni、OM-Ni、OX-Ni、RES-Ni 对土壤酶活性的影响较小。

土壤酶活性与 DTPA-Ni 间存在正相关关系(表 4),5 种土壤酶活性与 DTPA-Ni 的相关系数大小顺序为:碱性磷酸酶 > 酸性磷酸酶 > 脲酶 > 多酚氧化酶 > 过氧化氢酶, DTPA-Ni 和 T-Ni 均可用于表征土壤酶活性的水平。

表 2 土壤酶活性的分析结果

Tab.2 The results of enzymatic activities in the tested soils

镍添加量 (mg·kg ⁻¹)	碱性磷酸酶		酸性磷酸酶		脲酶		多酚氧化酶		过氧化氢酶	
	活性 ¹⁾	PI (%)	活性 ¹⁾	PI (%)	活性 ¹⁾	PI (%)	活性 ¹⁾	PI (%)	活性 ¹⁾	PI (%)
0	3.00 ± 0.10	0.0	15.11 ± 1.70	0.0	1.88 ± 0.60	0.0	7.18 ± 2.91	0.0	3.44 ± 0.26	0.0
100	2.55 ± 0.46	15.0	13.02 ± 3.32	13.9	1.91 ± 0.52	-1.6	6.52 ± 2.39	9.2	3.34 ± 0.14	2.9
200	2.09 ± 0.16	30.2	13.04 ± 1.44	13.7	1.82 ± 0.24	3.2	7.76 ± 3.35	-8.1	3.53 ± 0.10	-2.7
300	1.98 ± 0.42	34.1	7.04 ± 3.25	53.4	1.64 ± 0.08	12.8	6.49 ± 2.80	9.6	3.31 ± 0.18	3.9
400	1.53 ± 0.11	49.0	3.19 ± 1.56	78.9	1.56 ± 0.09	17.0	5.51 ± 1.46	23.3	3.37 ± 0.19	1.9
800	1.26 ± 0.03	58.0	2.40 ± 0.14	84.1	1.48 ± 0.09	21.3	4.20 ± 0.78	41.6	3.24 ± 0.07	5.8
1600	0.98 ± 0.42	67.3	2.22 ± 0.78	85.3	1.48 ± 0.12	21.3	3.70 ± 1.01	48.4	3.43 ± 0.30	0.4

1)表中 5 种酶活性数据为 2 次重复和平衡样分析结果的平均值 ± 标准差。

表 3 土壤酶活性与各种形态镍的关联系数

Tab.3 The coefficients of connection degree between soil enzymatic activities and nickel fractions

形态	EX-Ni (X_1)	CAB-Ni (X_2)	OX-Ni (X_3)	OM-Ni (X_4)	RES-Ni (X_5)	DTPA-Ni (X_6)	T-Ni (X_7)	关联序
碱性磷酸酶	0.701	0.694	0.679	0.685	0.687	0.698	0.689	$X_1 > X_6 > X_2 > X_7 > X_5 > X_4 > X_3$
酸性磷酸酶	0.574	0.570	0.562	0.565	0.560	0.572	0.565	$X_1 > X_6 > X_2 > X_4 > X_7 > X_3 > X_5$
脲酶	0.583	0.580	0.565	0.571	0.569	0.581	0.573	$X_1 > X_6 > X_2 > X_7 > X_4 > X_5 > X_3$
多酚氧化酶	0.618	0.607	0.587	0.591	0.600	0.613	0.602	$X_1 > X_6 > X_2 > X_7 > X_5 > X_4 > X_3$
过氧化氢酶	0.618	0.594	0.577	0.583	0.603	0.602	0.608	$X_1 > X_7 > X_5 > X_6 > X_2 > X_4 > X_3$

表 4 土壤酶活性与 DTPA-Ni、T-Ni 间的关系

Tab.4 The relationship between enzymatic activities and DTPA-Ni, T-Ni in treated soil

土壤酶	DTPA-Ni		T-Ni	
	拟合方程 ¹⁾	相关系数 ²⁾	拟合方程 ¹⁾	相关系数 ²⁾
碱性磷酸酶	$Y = 4.578 - 1.366 \times \lg X$	0.913**	$Y = 4.167 - 0.934 \times \lg X$	0.967**
酸性磷酸酶	$Y = 3.199 - 0.154 \times \lg X$	0.812*	$Y = 3.241 - 0.107 \times \lg X$	0.876**
脲酶	$Y = 9.392 - 4.418 \times \lg X$	0.770*	$Y = 7.689 - 3.157 \times \lg X$	0.853**
多酚氧化酶	$Y = 4.771 - 0.475 \times \lg X$	0.671*	$Y = 4.431 - 0.347 \times \lg X$	0.760*
过氧化氢酶	$Y = 13.270 - 3.345 \times \lg X$	0.299	$Y = 9.394 - 2.075 \times \lg X$	0.287

注: 1) Y 为土壤酶活性, X 为 DTPA-Ni 或 T-Ni; 2) * 指 $P < 0.05$, 达到显著水平; ** 指 $P < 0.01$, 达到极显著水平。

4 结 论

(1) 土壤中不同种类的酶在重金属胁迫下产生不同的效应, 无论土壤中镍是低剂量还是高剂量, 镍对酸性磷酸酶活性和碱性磷酸酶活性均表现为抑制作用, 且对酸性磷酸酶活性的抑制率较碱性磷酸酶的大; 低剂量的镍 (小于 100 mg/kg) 对土壤脲酶活性有激活作用, 高剂量时则有抑制作用; 镍对多酚氧化酶也有抑制作用, 而对过氧化氢酶的抑制作用则较小。根据各种酶对镍的敏感程度, 可以采用酸性磷酸酶、碱性磷酸酶和脲酶作为土壤镍污染监测和评价的主要生化指标。

(2) DTPA-Ni 与其它形态镍在土壤中具有较好相关性, 尤与可交换态和弱专性吸附态之间更具有较好的相关关系; DTPA-Ni 与土壤各种酶活性相互间相关性好、关联度大。因此, 用 DTPA-Ni 来表征土壤镍的生物有效性是可行的。

参考文献:

- [1] 龚平, 孙铁珩, 李培军. 重金属对土壤微生物的生态效应[J]. 应用生态学报, 1997, 8(2): 218-224.
- [2] 史长青. 重金属污染对水稻土酶活性的影响[J]. 土壤通报, 1995, 26(1): 34-35.
- [3] ROMAN G K, MARGARET M C. Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem [J]. Soil Biology & Biochemistry, 1997, 29(2): 179-190.
- [4] ACOSTA-MARTINEZ V, TABATABAI M A. Arylamidase activity in soils: effect of trace elements and relationships to

soil properties and activities of amidohydrolases [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2001, 33(1): 17-23.

- [5] TAKASHI K, KAZUTOSHI S, SHIGEKU G, et al. Copper and zinc fractions affecting microorganisms in long-term sludge-amended soils[J]. Bioresource Technology, 2001, 79(2): 135-146.
- [6] GARBISU C, ALKORTA I. Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment[J]. Bioresource Technology, 2001, 77(3): 229-236.
- [7] BROOKS R R, CHAMBERS M F, NICKS L J, et al. Phytomining[J]. Perspectives, 1998, 3(9): 359-362.
- [8] ROBINSON B H, CHIARUCCI A, BROOKS R R, et al. The nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii* as a potential agent for phytoremediation and phytomining of nickel [J]. Journal of Geochemical Exploration, 1997, 59(2): 75-86.
- [9] 王新鹏, 曲尔复. 壤土中可给态镍浸提方法的研究[J]. 环境科学学报, 1993, 13(2): 223-232.
- [10] 程晓东, 郭明新. 河流底泥重金属不同形态的生物有效性[J]. 农业环境保护, 2001, 20(1): 19-22.
- [11] 中国科学院南京土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究法[M]. 北京: 科学出版社, 1985: 260-275.
- [12] 鲍士旦. 土壤农化分析(第3版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [13] LI Z B, SHUMAN L M. Redistribution of forms of zinc, cadmium and nickel in soils treated with EDTA [J]. The Science of the Total Environment, 1996, 191(1): 95-107.
- [14] 代燕, 程鹏. 镍酶及其模型化合物的研究[J]. 化学进展, 2002, 14(1): 47-55.
- [15] [苏] 哈兹耶夫 Ф X. 土壤酶活性[M]. 北京: 科学出版社, 1980: 24.

Fractions of Additive Nickel and Relationship with Enzymatic Activities in Soil

CAI Xin-de^{1,2}, QIU Rong-liang¹, TANG Ye-tao¹, FANG Xiao-hang¹, CHEN Gui-zhu¹

(1. The school of Environmental Science & Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. South China Institute for Environmental Science, SEPA, Guangzhou 510655, China)

Abstract: By cultural experiment method, fractions of additive nickel in soil and impacts under different concentration on five kinds of soil enzymes were studied. The percentages of inhibition (PI) of alkaline phosphatase and acid phosphatase were 15.0% – 67.3%, 13.9% ~ 85.3%, respectively with the added nickel from 100 to 1600 mg/kg, their activities were strongly inhibited by additive nickel. The PI of urease was from – 1.6% to 21.3%, its activity was stimulated under low added nickel concentration, but deactivated under high concentration. The polyphenol oxidase activity was obviously inhibited, while the catalase activity was changed lightly under different nickel levels. The results indicated that acid phosphatase activity, alkaline phosphatase activity and urease activity can be used as primary biochemical indexes in soil quality assessment. According to the results of the correlation analysis and connection degree analysis between forms of nickel and soil enzymatic activities, it was proved that DTPA extracted nickel form had significant correlation and maximal connection degree coefficient with soil enzymes. Therefore, it was feasible to use the DTPA extracted nickel to evaluate the bioavailability of soil nickel contamination.

Key words: soil; nickel; fraction; soil enzyme activity