

不同价态铬的土壤碱性磷酸酶效应模拟研究

和文祥¹, 王娟¹, 高亚军¹, 田海霞¹, 曹卫东²

(1.西北农林科技大学资源环境学院, 陕西 杨凌 712100; 2.中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081)

摘要:铬是环境中四大污染元素之一,其不同价态间对生物的生态毒性差异较大。采用模拟方法对 Cr^{3+} 和 Cr^{6+} 的土壤碱性磷酸酶效应进行了研究。结果表明,铬显著抑制了土壤碱性磷酸酶活性,其中 Cr^{3+} 的抑制作用远强于 Cr^{6+} , 土壤轻度 Cr^{3+} 和 Cr^{6+} 污染时的临界浓度分别为 151 和 1 132 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 二者相差 6.5 倍;碱性磷酸酶活性及动力学特征参数 $V_{\max}$ 、 k 等与 Cr 浓度间达显著或极显著负相关,揭示土壤磷酸酶活性及 $V_{\max}$ 、 k 可作为土壤 Cr 污染的监测指标之一;模型 $U=\beta_0/(\beta_1\times C+1)$ 揭示酶与铬间的机理为完全抑制,动力学则进一步细化为非竞争性抑制;计算获得的抑制常数 K_i 为 $\text{Cr}^{3+}<\text{Cr}^{6+}$, 反映出 Cr^{3+} 与土壤酶活性位点的亲和力远强于 Cr^{6+} 。

关键词:铬;价态;土壤碱性磷酸酶;动力学;抑制常数

中图分类号:X131.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2010)01-0104-06

Effect of Different Valences Chromium on Soil Alk-phosphatase Characteritics

HE Wen-xiang¹, WANG Juan¹, GAO Ya-jun¹, TIAN Hai-xia¹, CAO Wei-dong²

(1.College of Resources and Environment; Northwest A & F University; Yangling Shaanxi 712100, China; 2.Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract:Chromium is was one of four heavy metals to pollute environment. However, its ecological toxicity to organism varies considerably for different species of chromium. In this paper, by simulative, soil alkaline phosphatase parameters are applied to study the effect of different valences chromium. Results showed that the Soil alkaline phosphatase activity was remarkably inhibited by chromium. Cr^{3+} was more seriously inhibited than Cr^{6+} , the critical concentrations were 151 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ and 1 132 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ for Cr^{3+} and Cr^{6+} respectively when soil is slightly polluted, 6.5 times difference between Cr^{3+} and Cr^{6+} . Alkaline phosphatase activity, $V_{\max}$ and k could be indexes to monitor soils polluted by chromium, because there were significant or remarkably significant correlation between soil alkaline phosphatase parameters and chromium concentrations. Their reaction mechanism was fully inhibited by model $U=\beta_0/(\beta_1\times C+1)$, and non-competitive inhibition by soil enzyme kinetic further. The inhibition constant K_i was $\text{Cr}^{3+}<\text{Cr}^{6+}$, Cr^{3+} had stronger affinity than Cr^{6+} with active sites of alkaline phosphatase.

Keywords:chromium, valence, soil alkaline phosphatase, kinetic characteristic, inhibition constant

土壤酶作为土壤重要组成部分,在营养物质转化、能量代谢、污染土壤修复等过程中发挥着重要作用,故被称为土壤生态系统的中心^[1-4]。磷酸酶是其中主要酶类,一方面可转化有机磷为无机磷,提高土壤磷的生物有效性;另一方面在我国施用的农药品种中,杀虫剂占 70%,其中有机磷又占 70%,它们经磷

酸酶催化后,毒性降为母本化合物的 0.5%~1.67%^[5],从而修复环境。

近年来我国总体环境质量有所好转,但重金属污染仍有 2 000 万 hm^2 ,约占耕地总面积的 1/5^[6]。铬与汞、镉、铅并称四大污染元素,土壤中铬含量 1.04~3 015 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[7],其中的 Cr^{6+} 由于被土壤胶体吸附较弱、移动性较强,从动、植物角度获得的生态毒性比 Cr^{3+} 强 100~1 000 倍^[8-9]。许多研究^[10-13]揭示利用土壤酶开展土壤生态毒理研究具有方便、快捷、准确、实时等优点,但鲜见不同价态铬对土壤酶活性的报道,且现有结果也不尽一致。如 Samborska A.等^[14]发现 Cr^{3+} 对纯脲酶的毒性要强于 Cr^{6+} ,其生态剂量 ED_{50} 为 0.2 和

收稿日期:2009-06-05

基金项目:西北农林科技大学“青年学术骨干人才支持”计划,农业部公益性行业(农业)科研专项(200803029-13 和 200903015-05);国家自然科学基金项目(40301022)

作者简介:和文祥(1968—),男,陕西黄龙人,教授,博士,博士生导师,从事土壤生态毒理及土壤生物化学方面研究。

E-mail:wxhe1968@163.com

0.4 mg·kg⁻¹;Huang 等^[15]研究表明总铬显著激活碱性磷酸酶活性;王新新^[16]认为 Cr⁶⁺抑制土壤脲酶、多酚氧化酶活性。可见有必要开展不同价态铬的土壤酶效应研究。为此本文拟采用室内模拟方法,对 Cr⁶⁺和 Cr³⁺的土壤碱性磷酸酶效应进行系统研究,获得其剂量~效应关系及作用机理,以期对土壤污染监测、环境保护及农业可持续发展等提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

2006年6月采集陕西3种主要土壤:褐土(简育干润淋溶土,Hapli-Ustic Argosols)、黄绵土(黄土正常新成土,Loessi-Orthic Primosols)和风沙土(干旱砂质新成土,Aridi-Sandic Primosols)。采样时,先去除0~5 cm的表土,五点法取5~20 cm土样,混匀风干,过1 mm尼龙筛后备用。常规方法^[17]测定土壤化学性质,结果见表1。

表1 供试土样的化学性质

Table 1 The chemical properties of soil tested

土壤	采样地点	编号	有机质/ g·kg ⁻¹	全磷/ g·kg ⁻¹	全氮/ g·kg ⁻¹	碱解氮/ mg·kg ⁻¹	pH
褐土	渭南	1	24.60	1.65	1.18	71.00	8.12
		2	10.36	1.07	0.66	33.00	8.43
黄绵土	延安	3	13.96	1.26	0.76	46.00	8.25
		4	11.60	1.18	0.62	28.00	8.49
风沙土	榆林	5	7.74	0.58	0.59	45.00	8.06
		6	7.29	0.62	0.54	33.00	8.27

1.2 试验方法

5.00 g土样加5滴甲苯后,添加5 mL不同质量浓度(0、250、500、1 000、2 500、5 000 mg·kg⁻¹)的Cr⁶⁺(K₂Cr₂O₇)或Cr³⁺(CrCl₃)溶液,混匀30 min后,加入不同浓度(酶活性:0.01 mol·L⁻¹;动力学:0.001、0.002 5、0.005、0.010 mol·L⁻¹)磷酸苯二钠溶液20 mL,37℃培养,每隔3 h或6 h取样1 mL,连续进行4次,分别用比色法^[18]测定酶活性,单位以ph(OH)μg·g⁻¹·h⁻¹表示。每处理重复3次,并设无底物和无土壤处理对照。

1.3 数据处理

1.3.1 土壤酶动力学参数K_m和V_{max}^[19]

经典米氏方程如下:

$$V_0 = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m + [S]}$$

经数学变换为:

$$\frac{1}{t} \ln \frac{[S_0]}{[S]} = -\frac{1}{K_m} \times \frac{([S_0] - [S])}{t} + \frac{V_{\max}}{K_m}$$

式中: t 为酶促反应时间; $[S_0]$ 和 $[S]$ 分别为初始和 t 时间时的底物浓度。

将不同时间的 $\frac{1}{t} \ln \frac{[S_0]}{[S]}$ 和 $\frac{1}{t} ([S_0] - [S])$ 值进行线性拟合,即可求得 K_m 和 $V_{\max}$ 值。

1.3.2 土壤酶促反应速度常数 k

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{V_{\alpha}}{V_{\alpha} - V_t}$$

式中: V_{α} 、 V_t 分别为最大和经 t 时间产生酚的量。

1.3.3 动力学抑制常数 K_i

计算参照文献^[20]。

2 结果与讨论

2.1 不同价态铬对土壤碱性磷酸酶活性的影响

由对照处理碱性磷酸酶活性(图1)看出褐土高、低有机质含量土样酶活性为61.63、50.40 μg·g⁻¹·h⁻¹,二者相差1.22倍,其间达到了极显著差异水平。其他土样也表现出类似变化。风沙土的酶活性与褐土、黄绵土间也达到极显著水平。相关分析表明酶活性与有机质($r=0.940^{**}$)、全磷($r=0.986^{**}$)和全氮($r=0.904^{*}$)之间呈显著或极显著正相关。揭示土壤碱性磷酸酶活性可表征土壤的肥力水平。

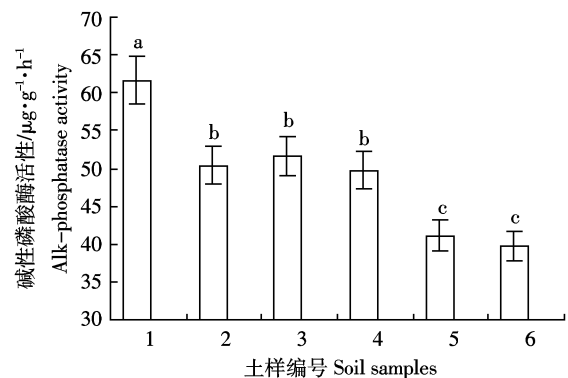


图1 供试土壤碱性磷酸酶活性

Figure 1 The alk-phosphatase activity of soils tested

由供试土壤碱性磷酸酶相对活性(表2)看出:(1)铬加入导致除2号外,其他土样碱性磷酸酶活性降低。揭示铬对碱性磷酸酶具有明显抑制作用,其中Cr³⁺的作用更强。这主要是由于加入的铬会与酶蛋白上的巯基和含咪唑的配位体等结合,引起酶部分变性失活,导致表观酶活性降低。如铬浓度为5 000 mg·kg⁻¹时,Cr⁶⁺和Cr³⁺处理的5、6号酶活性分别为对照的80.20%、72.32%和23.14%、17.28%,Cr³⁺降幅为Cr⁶⁺的3.88和2.99倍。(2)随铬浓度增加,土壤碱性磷酸酶

表 2 不同价态铬对供试土样的相对碱性磷酸酶活性的影响(%)
Table 2 Soil relative alk-phosphatase activity affected by different valence chromium(%)

Cr	土样编号	铬质量浓度/mg·kg ⁻¹					
		0	250	500	1 000	2 500	5 000
Cr ³⁺	1	100a	93.42b	88.09c	79.63d	55.81e	36.07f
	2	100a	101.72a	100.00a	85.42b	54.54e	26.23f
	3	100a	91.06b	86.59c	76.90d	56.79e	32.57f
	4	100a	95.83b	91.86b	85.60c	59.94d	34.49f
	5	100a	89.02b	80.78c	65.69d	24.97e	23.14e
	6	100a	94.46b	92.51b	69.39d	34.87e	17.28f
Cr ⁶⁺	1	100a	101.62a	96.77a	87.88b	86.27b	82.23c
	2	100a	96.59a	95.62a	100.00a	94.16b	72.73c
	3	100a	96.99a	98.12a	101.88a	86.82b	76.65c
	4	100a	97.12a	94.13a	92.54b	81.37c	66.01d
	5	100a	97.09a	101.16a	97.09a	87.77b	80.20c
	6	100a	98.19a	98.80a	96.99a	87.97b	72.32c

注:碱性磷酸酶相对活性=处理样品酶活性/对照样品酶活性×100%;同行数据间的不同字母表明 Duncan's 多重比较差异显著(P<0.05)。

活性持续减少,绝大多数处理的差异均达到了显著水平($P<0.05$),说明抑制程度加深。(3)采用模型 $U=A+B\times C$ 、 $U=A/(1+B\times C)$ 对铬浓度(C)和酶活性(U)关系拟合,结果(表 3)均达显著或极显著负相关,揭示碱性磷酸酶活性可作为土壤铬污染的指标之一。(4)Speir 等^[21]从米氏动力学方程推导出的 As^{5+} 抑制土壤酶活性的模型 $U=A/(1+B\times C)$,用来拟合外源污染物(C)与土壤酶活性(U)间关系,并赋予其信息,即可反映的作用机理为完全抑制作用;其中 A 、 B 为一定底物浓

度下受到抑制常数 K_i 、最大反应速度 V_{max} 和米氏常数 K_m 以及抑制类型等共同作用下形成的复合参数, A 为污染物浓度为 0 时土壤酶活性理论值。拟合方程(表 3) $U=A/(1+B\times C)$ 拟合效果较好,相关系数均大于 0.889*,表明铬对土壤碱性磷酸酶的作用机理为完全抑制作用,包括完全竞争抑制或完全非竞争性抑制。(5)生态剂量 ED_{10} 值表示土壤受铬轻微污染时的量^[22-23],是土壤碱性磷酸酶活性为对照土样酶活性 90% 时,试样中需加入的外源铬量。总体上供试土壤对 Cr^{6+} 的响应为有机质含量高的土样碱性磷酸酶 ED_{10} 值大于低的,这是由于土壤有机质含量越高,土壤对碱性磷酸酶的保护和对铬的缓冲作用越强,对铬的响应越迟钝的缘故。(6) Cr^{6+} 污染土壤碱性磷酸酶 ED_{10} 比 Cr^{3+} 的大。 Cr^{6+} 的 ED_{10} 范围为 1 132~2 689 $mg\cdot kg^{-1}$, Cr^{3+} 的为 151~751 $mg\cdot kg^{-1}$,表明磷酸酶对 Cr^{3+} 更敏感、作用更强。(7)从土壤酶活性角度,土壤轻度污染的临界浓度分别为 Cr^{3+} 151 $mg\cdot kg^{-1}$, Cr^{6+} 1 132 $mg\cdot kg^{-1}$ 。

2.2 铬对土壤碱性磷酸酶动力学特征的影响

在酶动力学中^[19],米氏常数 K_m 表征酶与底物结合程度, K_m 值越小,酶与底物结合越牢固,亲合力越大;最大反应速度 V_{max} 是酶-底物复合物分解为酶和产物的速率,也是实现某种酶过程的土壤潜在能力的容量指标。反应速度常数 k 揭示反应在本质上是“快”还是“慢”,其值与底物浓度无关。

供试土样碱性磷酸酶动力学参数见表 4、5,从中可以看出:(1)供试土壤碱性磷酸酶 K_m 值在 1.24~6.79 $mmol\cdot L^{-1}$ 之间,最大幅度不超过 5.49 倍,即可认

表 3 土壤碱性磷酸酶活性(U)与铬质量浓度(C)的拟合方程
Table 3 The regression equations between soil alk-phosphatase activity and Cr concentration

Cr	土样	$U=A+B\times C$			$U=A/(1+B\times C)$		
		拟合方程	相关系数	$ED_{10}(mg\cdot kg^{-1})$	拟合方程	相关系数	$ED_{10}(mg\cdot kg^{-1})$
Cr ³⁺	1	$U=0.950-1.26\times10^{-4}C$	0.982**	751	$U=1.015\ 3/(1+3.26\times10^{-4}C)$	0.998**	341
	2	$U=1.026\ 7-1.60\times10^{-4}C$	0.987**	641	$U=1.10/(1+3.91\times10^{-4}C)$	0.979**	284
	3	$U=0.939\ 1-1.29\times10^{-4}C$	0.986**	727	$U=1.005\ 5/(1+3.43\times10^{-4}C)$	0.991**	324
	4	$U=0.984\ 5-1.33\times10^{-4}C$	0.994**	741	$U=1.038\ 1/(1+3.06\times10^{-4}C)$	0.988**	363
	5	$U=0.879\ 3-1.56\times10^{-4}C$	0.906*	565	$U=1.039\ 3/(1+7.35\times10^{-4}C)$	0.933**	151
	6	$U=0.947\ 8-1.73\times10^{-4}C$	0.957**	547	$U=1.075\ 3/(1+6.38\times10^{-4}C)$	0.992**	174
Cr ⁶⁺	1	$U=0.980\ 9-3.65\times10^{-5}C$	0.868*	2 689	$U=0.987\ 2/(1+4.79\times10^{-5}C)$	0.889*	2 322
	2	$U=1.008\ 4-4.97\times10^{-5}C$	0.924**	2 030	$U=1.010\ 2/(1+6.03\times10^{-5}C)$	0.920**	1 842
	3	$U=1.008\ 7-4.84\times10^{-5}C$	0.950**	2 085	$U=1.013\ 4/(1+6.11\times10^{-5}C)$	0.963**	1 818
	4	$U=0.987\ 7-6.64\times10^{-5}C$	0.997**	1 487	$U=0.999\ 8/(1+9.82\times10^{-5}C)$	0.997**	1 132
	5	$U=1.002\ 9-4.16\times10^{-5}C$	0.971**	2 413	$U=1.007\ 5/(1+5.20\times10^{-5}C)$	0.979**	2 139
	6	$U=1.009\ 7-5.58\times10^{-5}C$	0.994**	1 811	$U=1.015\ 8/(1+7.29\times10^{-5}C)$	0.986**	1 524

注:自由度 $n-2=4$, $r_{0.05}=0.811$, $r_{0.01}=0.917$ 。

表 4 Cr^{3+} 对土壤碱性磷酸酶动力学参数的影响Table 4 Effect of Cr^{3+} on kinetic parameters of alk-phosphatase in soils tested

土样 编号	Cr 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	K_m / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$V_{\max}$ / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	$V_{\max}/K_m$ ($\times 10^{-3}$)	k ($\times 10^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$)	r
1	0	4.80	167.25	34.85	17.57	-0.978**
	250	4.25	152.13	35.77	17.11	-0.984**
	500	3.91	142.40	36.40	16.76	-0.976**
	1 000	3.49	125.75	36.05	15.70	-0.974**
	2 500	1.85	75.71	40.84	12.58	-0.979**
	5 000	3.06	50.82	16.62	6.57	-0.944**
2	0	2.34	54.98	23.49	8.07	-0.983**
	250	2.04	53.14	26.09	8.29	-0.983**
	500	1.80	48.24	26.80	7.93	-0.963**
	1 000	1.24	40.99	33.11	7.68	-0.985**
	2 500	1.70	26.73	15.72	4.60	-0.713**
	5 000	—	—	—	—	—
3	0	6.79	162.56	23.94	13.72	-0.954**
	250	4.04	124.68	30.84	14.33	-0.986**
	500	4.18	119.82	28.68	13.49	-0.975**
	1 000	3.77	102.43	27.20	12.19	-0.950**
	2 500	2.97	71.67	24.10	9.57	-0.924**
	5 000	2.77	35.81	12.92	4.88	-0.857**
4	0	4.18	122.33	29.26	13.76	-0.964**
	250	3.39	108.33	31.98	13.61	-0.980**
	500	3.04	101.88	33.52	13.59	-0.946**
	1 000	2.93	88.28	30.12	11.88	-0.967**
	2 500	2.33	67.34	28.95	10.03	-0.965**
	5 000	1.90	35.40	18.66	5.64	-0.937**
5	0	3.34	105.40	31.54	13.38	-0.980**
	250	3.48	92.49	26.60	11.40	-0.984**
	500	3.52	83.61	23.78	10.20	-0.988**
	1 000	2.90	63.27	21.82	8.45	-0.978**
	2 500	2.99	24.03	8.03	3.11	-0.904**
	5 000	—	—	—	—	—
6	0	2.75	71.32	25.91	9.79	-0.986**
	250	2.61	64.58	24.72	9.05	-0.987**
	500	2.76	61.12	22.17	8.33	-0.987**
	1 000	2.09	40.82	19.56	6.25	-0.970**
	2 500	2.62	21.77	8.30	3.00	-0.872**
	5 000	—	—	—	—	—

注: 自由度 $n-2=14$, $r_{0.05}=0.497$, $r_{0.01}=0.623$, 下同。表 5 Cr^{6+} 对土壤碱性磷酸酶动力学参数的影响Table 5 Effect of Cr^{6+} on kinetic parameter of alk-phosphatase in soils tested

土样 编号	Cr 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	K_m / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$V_{\max}$ / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	$V_{\max}/K_m$ ($\times 10^{-3}$)	k ($\times 10^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$)	r
1	0	5.27	181.46	34.46	18.09	-0.964**
	250	4.77	175.02	36.73	18.51	-0.977**
	500	4.47	174.78	39.08	19.28	-0.937**
	1 000	4.39	165.06	37.58	18.36	-0.950**
	2 500	3.86	151.48	39.23	18.07	-0.967**
	5 000	3.92	123.00	31.36	14.37	-0.964**
2	0	3.86	137.52	35.60	16.32	-0.951**
	250	3.67	140.70	38.33	17.24	-0.940**
	500	3.51	139.07	39.58	17.43	-0.960**
	1 000	3.00	135.40	45.16	18.95	-0.971**
	2 500	3.86	151.48	39.22	18.07	-0.967**
	5 000	3.92	123.00	31.36	14.37	-0.964**
3	0	4.46	148.98	33.42	16.27	-0.944**
	250	4.17	146.64	35.18	16.62	-0.971**
	500	4.64	161.17	34.76	17.28	-0.940**
	1 000	4.64	160.61	34.58	17.17	-0.950**
	2 500	3.24	126.05	38.87	16.44	-0.929**
	5 000	4.43	110.10	24.87	11.97	-0.897**
4	0	3.75	133.71	35.67	16.02	-0.983**
	250	3.88	131.98	34.04	15.50	-0.976**
	500	3.31	124.62	37.68	15.97	-0.973**
	1 000	3.45	125.16	36.24	15.66	-0.975**
	2 500	2.22	100.43	45.18	15.64	-0.952**
	5 000	2.11	76.81	36.42	11.98	-0.989**
5	0	2.71	105.55	39.00	14.92	-0.990**
	250	2.33	105.26	45.19	16.06	-0.984**
	500	2.24	106.55	47.47	16.60	-0.974**
	1 000	2.15	103.87	48.33	16.47	-0.986**
	2 500	2.14	91.68	42.77	14.43	-0.977**
	5 000	2.17	80.02	36.86	12.39	-0.986**
6	0	4.19	107.71	25.73	12.01	-0.991**
	250	3.53	103.69	29.35	12.70	-0.990**
	500	4.05	112.37	27.75	12.81	-0.981**
	1 000	3.12	98.82	31.72	12.93	-0.986**
	2 500	2.94	89.17	30.37	11.97	-0.986**
	5 000	3.08	74.37	24.17	9.68	-0.976**

为 K_m 值处于同一数量级,这是由于土壤酶主要来源于微生物所致。(2)随铬浓度增加, Cr^{3+} 处理磷酸酶 K_m 总体呈降低趋势,表明 Cr^{3+} 导致酶与底物亲和力增强;而 Cr^{6+} 的变化极小。(3)供试土样磷酸酶 $V_{\max}$ 随肥力水平升高而总体增大,但大多处理未达到显著水

平。揭示出高肥土样碱性磷酸酶含量较高,这与前面土壤酶活性的结果一致。(4)除 Cr^{6+} 的个别处理外,铬加入导致土壤碱性磷酸酶 $V_{\max}$ 值降低,表明添加铬后降低了碱性磷酸酶-底物复合物解离的速度,其中 Cr^{3+} 的降幅远大于 Cr^{6+} 。如1号土样5 000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,

Cr^{3+} 和 Cr^{6+} 处理的 $V_{\max}$ 为 50.82、123.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, 相差 2.46 倍。(5)Cr 浓度与土壤碱性磷酸酶 $V_{\max}$ 线性拟合结果(表 6)显示,二者关系达极显著负相关,揭示碱性磷酸酶 $V_{\max}$ 可表征土壤受铬污染的程度。同时结合 K_m 的变化,说明铬对土壤碱性磷酸酶作用机理为非竞争抑制。

供试土样碱性磷酸酶 $V_{\max}/K_m$ 值并没有明显差别,表明 Cr 对土壤酶促反应初速度影响不大。随铬浓度升高,供试土样碱性磷酸酶的 k 值逐渐减小。揭示从本质上减弱了反应速度,相关分析显示除 2 号土样外,其他土样磷酸酶 k 与铬浓度均达显著或极显著负相关。说明 $V_{\max}$ 和 k 值都可和酶活性一起作为铬污染程度的监测指标。

2.3 铬对土壤碱性磷酸酶的抑制特征的影响

铬作为一种重金属,对土壤酶的抑制程度可采用

表 6 土壤碱性磷酸酶动力学参数与铬质量浓度拟合方程
Table 6 The regression equations between soil alk-phosphatase activity and Cr concentration

Cr	土样	动力学参数	拟合方程	相关系数
Cr^{3+}	1	$V_{\max}$	$V_{\max} = 154.6 - 0.023 \ 1 \times C_{\text{Cr}}$	-0.962**
		k	$k = 17.78 - 0.002 \ 2 \times C_{\text{Cr}}$	-0.999**
	2	$V_{\max}$	$V_{\max} = 54.552 - 0.011 \ 5 \times C_{\text{Cr}}$	-0.993**
		k	$k = 8.576 \ 4 - 0.001 \ 5 \times C_{\text{Cr}}$	-0.963**
	3	$V_{\max}$	$V_{\max} = 136.47 - 0.021 \ 8 \times C_{\text{Cr}}$	-0.943**
		$V_{\max}/K_m$	$V_{\max}/K_m = 29.125 - 0.002 \ 9 \times C_{\text{Cr}}$	-0.887*
		k	$k = 14.251 - 0.001 \ 9 \times C_{\text{Cr}}$	-0.995**
	4	$V_{\max}$	$V_{\max} = 112.15 - 0.016 \ 1 \times C_{\text{Cr}}$	-0.979**
		$V_{\max}/K_m$	$V_{\max}/K_m = 32.573 - 0.002 \ 5 \times C_{\text{Cr}}$	-0.906*
		k	$k = 13.966 - 0.001 \ 7 \times C_{\text{Cr}}$	-0.995**
	5	$V_{\max}$	$V_{\max} = 100.7 - 0.031 \ 7 \times C_{\text{Cr}}$	-0.992**
		$V_{\max}/K_m$	$V_{\max}/K_m = 29.79 - 0.008 \ 7 \times C_{\text{Cr}}$	-0.988**
Cr^{6+}	1	$V_{\max}$	$V_{\max} = 179.22 - 0.011 \ 3 \times C_{\text{Cr}}$	-0.996**
		k	$k = 17.028 - 0.000 \ 8 \times C_{\text{Cr}}$	-0.896*
	2	$V_{\max}$	$V_{\max} = 142.45 - 0.010 \ 2 \times C_{\text{Cr}}$	-0.990**
		$V_{\max}$	$V_{\max} = 156.78 - 0.009 \ 4 \times C_{\text{Cr}}$	-0.889*
	3	k	$k = 17.366 - 0.000 \ 9 \times C_{\text{Cr}}$	-0.875*
	4	$V_{\max}$	$V_{\max} = 133.34 - 0.011 \ 6 \times C_{\text{Cr}}$	-0.992**
		k	$k = 16.257 - 0.000 \ 7 \times C_{\text{Cr}}$	-0.902*
	5	$V_{\max}$	$V_{\max} = 107.36 - 0.005 \ 5 \times C_{\text{Cr}}$	-0.987**
		k	$k = 16.265 - 0.000 \ 7 \times C_{\text{Cr}}$	-0.866*
	6	$V_{\max}$	$V_{\max} = 108.46 - 0.007 \times C_{\text{Cr}}$	-0.960**
		k	$k = 12.882 - 0.000 \ 6 \times C_{\text{Cr}}$	-0.886*

抑制常数 K_i 表征,其值越小,说明铬与土壤酶结合形成中间复合物的亲和力越牢固,对酶的抑制更强。表 7 显示:(1)不同价态铬对土壤碱性磷酸酶的抑制常数有较大差异,除 2 号土样外,其余土样的 Cr^{6+} 比 Cr^{3+} 要高约 3.84~33.02 倍,表明 Cr^{3+} 与酶活性的亲和力较强,对酶促反应抑制作用较强。这与前面土壤酶活性等的结果一致;(2)与 K_m 值相比,抑制常数要远远大于米氏常数,揭示出碱性磷酸酶对底物的亲和力要强于对重金属铬的;(3) Cr^{3+} 对土壤的影响为土壤肥力水平越高,抑制常数越小;而 Cr^{6+} 的表现相反,揭示出不同价态铬对土壤酶影响机理有所差别,这主要与土壤中有机质、粘粒等含量不同有关。

表 7 铬对供试土壤碱性磷酸酶抑制常数($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)

Table 7 Inhibition constants of soil alkaline phosphatase effected by chromium

Cr	供试土样					
	1	2	3	4	5	6
Cr^{3+}	36.54	41.35	28.37	36.54	12.88	23.08
Cr^{6+}	211.54	—	242.31	140.38	294.87	194.44

3 结论

综上所述,碱性磷酸酶活性可表征土壤肥力水平高低。铬对碱性磷酸酶均具有抑制作用,其中三价铬抑制更强,表明其更敏感。铬浓度与土壤酶活性间达到显著或极显著负相关。计算得到了土壤轻度污染时的生态剂量 ED_{10} 值, Cr^{6+} 为 1 132~2 689 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, Cr^{3+} 为 151~751 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 土壤碱性磷酸酶对六价铬的反应较迟钝。六价铬导致土壤酶促反应的 K_m 基本不变, $V_{\max}$ 值减小,揭示其的作用机理为非竞争性抑制;而三价铬则使土壤酶促反应的 K_m 降低, $V_{\max}$ 值减小,其作用机理为混合型抑制,但以非竞争性抑制为主。 $V_{\max}$ 和 k 值可和酶活性一起做为铬污染程度的监测指标;计算获得的抑制常数 K_i 为 $\text{Cr}^{3+} < \text{Cr}^{6+}$, 反映出 Cr^{3+} 与土壤酶活性位点的亲和力远强于 Cr^{6+} 。

参考文献:

- [1] Tabatabai M A, Dick W A. Enzymes in soil. Research and developments in measuring activities[A]//Burns R G, Dick R P. (Eds.), Enzymes in the Environment. Activity, Ecology, and Applications[M]. New York: Marcel Dekker, Inc., 2002:567-595.
- [2] Caldwell B A. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: A review[J]. *Pedobiologia*, 2005, 49:637-644.
- [3] 张丽莉,陈利军,刘桂芬,等. 污染土壤的酶学修复研究进展[J]. 应用

- 生态学报, 2003, 14(12): 2342-2346.
- Zhang L L, Chen L J, Liu G F, et al. Advance in enzymological remediation of polluted soils[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2003, 14(12): 2342-2346.
- [4] 周礼恺. 土壤酶学[M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- Zhou L K, Soil enzyme[M]. Beijing: Science Press, 1987.
- [5] Nannipieri P, Bollag J M. Use of enzymes to detoxify pesticides-contaminated soils and waters[J]. *J Environ Qual*, 1991, 20: 510-517.
- [6] 肖鹏飞, 李法云, 付宝荣, 等. 土壤重金属污染及植物修复研究[J]. 辽宁大学学报, 2004, 31(3): 27-28.
- Xiao P F, Li F Y, Fu B R, et al. Soil contaminated by heavy metal and its phytoremediation[J]. *Journal of Liaoning University*, 2004, 31(3): 27-28.
- [7] Dai J, Becquer T, Rouiller J H, et al. Heavy metal accumulation by two earthworm species and its relationship to total and DTPA extractable metals in soils[J]. *Soil Biol Biochem*, 2004, 36: 91-98.
- [8] Arun K S, Carlos C, Herminia L T, et al. Chromium toxicity in plants[J]. *Environment International*, 2005, 31(5): 739-753.
- [9] Grabarczyk M, Korolczuk M, Tyszczuk T. Extraction and determination of hexavalent chromium in soil samples[J]. *Annl Bioanal Chem*, 2006, 386: 357-362.
- [10] 周礼恺, 张志明, 曹承绵, 等. 土壤的重金属污染与土壤酶活性[J]. 环境科学学报, 1985, 5(2): 176-183.
- Zhou L K, Zhang Z M, Cao C M, et al. Heavy metal pollution and enzymic activity of soil [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 1985, 5(2): 176-183.
- [11] Grigorydn K V, Galstyan A S. Effect of irrigation water polluted with industrial waste on the enzymatic activity of soils[J]. *Soviet Soil Science*, 1979, 11(2): 220-228.
- [12] 和文祥, 陈会明, 冯贵颖, 等. 汞铬砷元素污染土壤的酶监测研究[J]. 环境科学学报, 2000, 20(3): 338-343.
- He W X, Cheng H M, Feng G Y, et al. Study on enzyme index in soils polluted by mercury, chromium and arsenic[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2000, 20(3): 338-343.
- [13] Renellaa G, Ortigobaa A L R, Landia 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 & Biochemistry*, 2003, 35: 1203-1210.
- [14] Samborska A, Stepniewska Z, Stepniewski W. Influence of different oxidation states of chromium (VI, III) on soil urease activity[J]. *Geoderma*, 2004, 122(2-4): 317-322.
- [15] HUANG Shun-hong, PENG Bing, YANG Zhi-hui, et al. Chromium accumulation, microorganism population and enzyme activities in soils around chromium-containing slag heap of steel alloy factory[J]. *Trans Nonferrous Met Soc China*, 2009, 19: 241-248.
- [16] 王新新, 张颖, 王元芬. 底泥铬污染的纳米铁粉修复及其土壤酶活性动态[J]. 生态环境, 2008, 17(6): 2207-2211.
- Wang X X, Zhang Y, Wang Y F. Remediation of Cr(VI)-contaminated sediments using nanoscale iron and dynamics of soil enzyme activity[J]. *Ecology and Environment*, 2008, 17(6): 2207-2211.
- [17] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1997: 25-151.
- Bao S D. Analysis of soil Agricultural chemistry[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 1997: 25-151.
- [18] 关松荫. 土壤酶及其研究方法 [M]. 北京: 农业出版社, 1987: 132-134.
- Guan S Y. Soil enzyme and its research methods[M]. Beijing: Agricultural Press, 1987: 132-134.
- [19] 和文祥, 朱铭莪. 陕西土壤脲酶活性与土壤肥力关系研究. II 土壤脲酶的动力学特征[J]. 土壤学报, 1997, 34(1): 42-52.
- He W X, Zhu M E. Relationship between urease activity and fertility of soils in Shaanxi Province. II Soil urease kinetic characteristics[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 1997, 34(1): 42-52.
- [20] 施巧琴. 酶工程[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 392-393.
- Shi Q Q. Enzymatic engineer [M]. Beijing: Science Press, 2005: 392-393.
- [21] Speir T W, Kettles H A, Parshotam A, et al. Simple kinetic approach to determine the toxicity of As(V) to soil biological properties[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, 31: 705-713.
- [22] Speir T W, Kettles H A, Parshotam A, et al. A simple kinetic approach to derive the ecological dose value ED_{50} for the assessment of Cr(VI) toxicity to soil biological properties[J]. *Soil Biol & Biochem*, 1995, 27(6): 801-810.
- [23] Welp G, Wbrummer G. Toxicity of increased amount of chemicals and the dose-response curves for heterogeneous microbial populations in soil[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1997, 37: 37-44.